



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

Discipline ou spécialité :

Ecologie Fonctionnelle

Présentée et soutenue par :

Mme RAYENNE SARIA

le mercredi 3 décembre 2014

Titre :

ETUDE DES MECANISMES DE TOXICITE DES NANOTUBES DE
CARBONE MULTI-PAROIS CHEZ LE MODELE AMPHIBIEN XENOPUS
LAEVIS

Ecole doctorale :

Sciences de l'Univers de l'Environnement et de l'Espace (SDUEE)

Unité de recherche :

Ecologie Fonctionnelle (ECOLAB)

Directeur(s) de Thèse :

M. ERIC PINELLI

M. LAURY GAUTHIER

Rapporteurs :

M. KHEREDDINE OUALI, UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA

M. STEPHANE BETOULLE, UNIVERSITE DE REIMS

Membre(s) du jury :

M. FRANCK GILBERT, UNIVERSITE TOULOUSE 3, Président

M. ERIC PINELLI, INP TOULOUSE, Membre

M. LAURY GAUTHIER, UNIVERSITE TOULOUSE 3, Membre

M. PATRICE GONZALEZ, UNIVERSITE BORDEAUX 1, Membre

*Soyons reconnaissants aux personnes qui nous donnent
du bonheur; elles sont les charmants jardiniers
par qui nos âmes sont fleuries.*
Marcel Proust

Remerciements

À l'issue de la rédaction de cette recherche, je suis convaincue que la thèse est loin d'être un travail solitaire. En effet, je n'aurais jamais pu réaliser ce travail doctoral sans le soutien d'un grand nombre de personnes dont la générosité, la bonne humeur et l'intérêt manifestés à l'égard de ma recherche m'ont permis de progresser dans cette phase délicate de « l'apprenti chercheur ».

En premier lieu, je tiens à remercier mes directeurs de thèse, Laury GAUTHIER et Eric PINELLI, pour la confiance qu'ils m'ont accordée en acceptant d'encadrer ce travail doctoral, pour leurs multiples conseils et pour toutes les heures qu'ils ont consacré à diriger cette recherche.

Je remercie tout aussi sincèrement Stéphane BETOULLE, Kheireddine OUALI et Patrice GONZALEZ d'avoir accepté de relire cette thèse et d'en être rapporteurs. Merci à eux d'avoir contribué par leurs nombreuses remarques et suggestions à améliorer la qualité de ce mémoire, et je leur en suis très reconnaissante. Je tiens également à remercier Franck GILBERT d'avoir accepté d'être président du jury.

Qu'aurait été cette thèse sans la participation de l'ensemble des membres de l'équipe Écotoxicologie et Santé des Écosystèmes (ECSECO) et plus particulièrement Séverine JEAN-DUPUY, George MERLINA, Jérôme SILVESTRE, Jean KALLERHOFF mais aussi Christophe LAPLANCHE, David BAQUET et Florence MOUCHET.

Cette thèse n'aurait pas pu voir le jour sans la contribution et le dévouement du personnel du service d'exploration de la fonction respiratoire et médecine du sport et plus particulièrement le professeur Jacque RAMI et la technicienne Régine. Un grand merci à Frederic MARTINS et Jean-José MAORET, de la plateforme génome et transcriptome. Leur rigueur et leur pédagogie hors du commun ont donné une qualité exceptionnelle à ce travail de thèse.

Ce travail a également pu aboutir grâce à l'aide remarquable de ma collègue et amie Annie PERRAULT qui m'a soutenue aussi bien moralement qu'intellectuellement durant ces trois

années de dur labeur. Merci à elle d'avoir su être une maman, une copine mais aussi une partenaire hors du commun lors des expérimentations très délicates que nous avons eu l'occasion de réaliser ensemble durant cette thèse. Merci à elle aussi pour ces instants de rire que nous avons partagé et qui m'ont permis de me remotiver lors des moments difficiles que j'ai pu rencontrer durant ma thèse.

Je remercie également l'ensemble du personnel ECOLAB et plus particulièrement Annick CORREGE, Marie-josée TAVELLA, Virginie PAYRE-SUC et Catherine GIOVANNINI. Même si ces personnes n'ont pas directement été impliquées dans mon travail de thèse, elles ont néanmoins contribué par leur sympathie et leur bonne humeur à mon épanouissement au sein de mon lieu de travail quotidien.

Je tiens aussi par ce travail à rendre hommage à un très grand homme, Monsieur Bruno FAUCON. Un chercheur hors normes qui savait allier rigueur et humour. Saches que même si aujourd'hui tu ne fais plus partie de ce monde, tu resteras à tout jamais gravé dans ma mémoire et je ne pourrais à aucun moment oublier tout ce que tu as fait pour moi. Cette thèse elle est pour toi et pour la famille formidable que tu as.

Je ne pourrais jamais oublier l'ensemble des étudiants que j'ai eu l'occasion de rencontrer durant ma thèse et qui ont participé chacun à sa manière à ce travail. Floriane BOURDIOL, Désirée el AZZI, Abdoul BASTOYE, Lauris EVARISTE, Ingrid GONZALEZ, Oussama CHAMSSI, Elsa YKEN, Jessica KARAM, Loubna EL FELS, Moulka BRAIA et Clemens VON SCHEFFER... Merci pour chaque bon moment que nous avons passé ensemble.

Un grand merci va aussi à mes amis Carol, Dominique, Marion, Bedour, Kahina, Amel, Céline, Dimitri...qui m'ont soutenu du début et jusqu'au dernier jour de ma thèse. Ces personnes ont joué un rôle très important dans la concrétisation de mon rêve le plus cher, celui d'être « docteur ».

Mes remerciements vont aussi à ma famille avec cette question récurrente, « quand est-ce que tu soutiens cette thèse ? », bien qu'angoissante en période fréquente de doute, elle m'a permis de ne jamais dévier de mon objectif final. Merci à mon papa et ma maman qui n'ont jamais douté de moi, même dans les moments difficiles. Merci à eux de m'avoir toujours poussé à

aller le plus loin possible même si cela à leur a nécessité certains sacrifices. Merci à mes sœurs Lydia et Yasmine qui m'ont toujours épaulé dans les périodes de doute et les moments de nostalgie. Je remercie également ma tante Nadia, son mari Slimane et mes cousines Camélia, Lina et Nawel. Merci à eux de m'avoir accueilli et de m'avoir offert cette chaleur familiale qui me manquait tant.

Je clôture ces remerciements avec une attention particulière à mon cher et adorable mari Nasrallah. Ce n'était pas toujours facile pour lui de gérer les soirées de stress, de pleur et même de travail acharné qu'il a pu subir durant ces trois années de thèse. Je le remercie pour son soutien et son dévouement sans limites qui m'ont permis d'atteindre mon objectif. Je tiens également à le féliciter pour l'obtention de son titre de docteur en même temps que moi.

Table des matières

Liste des figures.....	1
Liste des tableaux	3
Liste des abréviations	4
Introduction générale.....	8
Références bibliographiques	14
Chapitre I : introduction bibliographique.....	16
I. Généralités sur les nanotubes de carbone	16
I.1. Définition des nanomatériaux	16
I.2. Structure et morphologie des nanotubes de carbone.....	16
I.3. Propriétés des nanotubes de carbone	18
<i>I.3.1. Propriétés mécaniques.....</i>	<i>19</i>
<i>I.3.2. Propriétés électriques</i>	<i>19</i>
<i>I.3.3. Propriétés chimiques</i>	<i>20</i>
<i>I.3.4. Propriétés optiques</i>	<i>20</i>
I.4. Synthèse des nanotubes de carbone	21
<i>I.4.1. Méthode de synthèse par arc électrique</i>	<i>21</i>
<i>I.4.2. Méthode de synthèse par ablation laser</i>	<i>22</i>
<i>I.4.3. Méthode de synthèse par dépôt chimique catalytique en phase vapeur (CCVD)</i>	<i>22</i>
I.5. Production et applications des nanotubes de carbone.....	23
<i>I.5.1. La production mondiale des nanotubes de carbone</i>	<i>23</i>
<i>I.5.2. Les domaines d'application des nanotubes de carbone</i>	<i>25</i>
II. Ecotoxicité des nanotubes de carbone	28
II.1. Etat de l'art	28
II.2. Etude de l'écotoxicité des NTC sur différents organismes	28
<i>II.2.1. Impact des NTC sur les micro-organismes.....</i>	<i>29</i>
<i>II.2.2. Impact des NTC sur les végétaux</i>	<i>30</i>
<i>II.2.3. Impact des NTC sur les organismes terrestres.....</i>	<i>32</i>
<i>II.2.4. Ecotoxicité des NTC vis-à-vis des organismes aquatiques</i>	<i>33</i>
II.2.4.1. Effets des NTC sur les microorganismes autotrophes et hétérotrophes aquatiques.	34
II.2.4.2. Effets des NTC sur les invertébrés benthiques et pélagiques	35

II.2.4.3. Effets des NTC sur les vertébrés pélagiques.....	37
III. Mécanismes de toxicité des NTC.....	39
III.1. Adsorption, absorption et translocation des NTC	39
III.2. Induction du stress oxydant.....	41
III.2.1. définition.....	41
III.2.2. Stress oxydant et nanotubes de carbone	42
III.2.3. Systèmes antioxydants	43
III.2.3.1. La superoxyde dismutase (EC 1.15.1.1).....	44
III.2.3.2. La glutathion peroxydase (EC 1.11.1.9).....	46
III.2.3.3. La catalase (EC 1.11.1.6)	47
III.2.3.4. La glutathion réductase (EC 1.6.4.2).....	48
III.2.3.5. Les peroxyrédoxines.....	49
III.2.4. Dégâts oxydatifs cellulaires	51
III.2.4.1. Dommages oxydatifs de l'ADN	51
III.2.4.2. peroxydation lipidique.....	53
III.2.4.3. Induction de la réponse inflammatoire	55
Références bibliographiques	58
Chapitre II : présentation du modèle biologique et des conditions d'exposition aux NTCMW	70
I. Le modèle biologique : l'amphibien <i>Xenopus laevis</i>	70
II. Elevage de l'amphibien <i>Xenopus laevis</i>	73
II.1. Elevage des adultes reproducteurs.....	73
II.2. Reproduction <i>in vivo</i> et élevage des larves jusqu'au stade 50 et 54.....	73
III. Evaluation de la toxicité des NTCMW vis-à-vis du model amphibien <i>X. laevis</i>	75
III.1. Protocole d'exposition des larves.....	75
III.2. Préparation des milieux d'exposition.....	76
III.2.1. Dispersion des NTC par un bain à ultrason (NTC bruts).....	77
III.2.2. Dispersion des NTC par la matière organique « suwannee river » (NTC dispersés).....	77
IV. Gestion des déchets contaminés par les nanotubes de carbone	78
Références bibliographiques	80
Chapitre III : mise en évidence de l'effet des NTCMW sur les larves de <i>Xenopus laevis</i>	82
I. Introduction.....	82

II. Production et caractérisation des NTCMW	84
III. Évaluation des mécanismes de toxicité des NTCMW	87
III.1. protocoles	87
<i>III.1.1. Evaluation de la toxicité aiguë des NTCMW</i>	87
<i>III.1.2. Mesure des paramètres du stress oxydant</i>	87
III.1.2.1. Mesure de la concentration du peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂).....	87
III.1.2.2. Mesure des activités enzymatiques impliquées dans la réponse au stress oxydant	88
<i>III.1.3. Mesure de la peroxydation des lipides</i>	92
<i>III.1.4. Mesure des dommages à l'ADN par le test des Comètes</i>	93
III.2. Analyses statistiques des données	98
III.3. Résultats	98
<i>III.3.1. Evaluation de la toxicité aiguë des NTCMW</i>	98
<i>III.3.2. Effet des NTCMW sur l'induction du stress oxydant</i>	99
III.3.2.1. Induction d'ERO par des larves exposées au NTCMW	100
III.3.2.2. Induction des enzymes du stress oxydant en présence de NTCMW	101
<i>III.3.3. Effets de la dispersion des NTCMW sur les paramètres du stress oxydant</i>	103
III.3.3.1. Impact des NTCMW dispersés sur la production d'H ₂ O ₂	103
III.3.3.2. Impact des NTCMW dispersés sur les activités enzymatiques GR, CAT et SOD	105
<i>III.3.4. Effet des NTCMW sur la peroxydation des lipides</i>	107
<i>III.3.5. Evaluation des effets génétiques des NTCMW par le test des Comètes</i>	108
IV. Discussion	110
V. Conclusion	117
Références bibliographiques	118
Chapitre IV : Mécanisme d'induction du stress oxydant chez les larves de <i>Xenopus laevis</i> exposées aux NTCMW bruts.....	122
I. Introduction.....	122
II Matériel et méthodes	126
II.1. Mesure du relargage des métaux par les NTCMW	126
II.2. Localisation des NTCMW dans les larves de <i>Xenopus laevis</i>	127
II.3 Dosages des paramètres physico-chimiques du milieu d'exposition (O ₂ , pH).....	127
II.4. Dosage des paramètres sanguins chez les larves de <i>X. laevis</i> exposées à des NTCMW bruts.....	129
II.5. Mesure de l'expression de gènes par une technique de RT-PCR quantitative (q RT-PCR) innovante (Fluidigm C1 single cell).....	130

II. 5.1. Principe de mesure	130
II.5.2. Préparation des échantillons.....	132
II.5.3. Préparation des réactifs	132
II.5.3.1. Préparation des ARN étalon (ARN spikes)	132
II.5.3.2. Préparation du pool d'amorces à 500 mM.....	133
II.5.3.3. Préparation de la solution de lyse (Lysis Mix)	135
II.5.3.4. Préparation du mix de rétro transcription (RT Final Mix).....	135
II.5.3.5. Préparation de la solution de pré-amplification (PreAmp final mix).....	135
II.5.3.6. Préparation de la solution de marquage des cellules mortes et vivantes (LIVE/DEAD Cell Staining solution)	136
II.5.4. Préparation de la puce C1.....	136
II.5.4.1. Pré-remplissage de la puce	136
II.5.4.2. Préparation des cellules (Cell Mix)	137
II.5.4.3. Chargement des cellules	138
II.5.4.4. Lyse, retro-transcription (RT) et pré-amplification sur puce C1	139
II.5.4.5. Récupération des produits pré-amplifiés	140
II.5.5. Préparation des tubes contrôles	140
II.5.5.1. Lyse et RT.....	140
II.5.5.2. Pré-amplification	141
II.5.5.3. Dilution et dénaturation	141
II.5.6. Quantification de l'expression des gènes cibles par le système BioMark.....	141
II.5.6.1. Préparation des échantillons (Sample Pre-Mix)	141
II.5.6.2. Préparation des amorces (Primer Pre-Mix).....	142
II.5.6.3. Chargement de la plaque.....	142
II.5.7. Exploitation des résultats	143
II.6. Traitement statistique des données	143
III. Résultats	145
III.1. Evaluation du relargage des métaux par les NTCMW dans le milieu d'exposition	145
III.2. Détection de la présence de NTCMW chez les larves de <i>X. laevis</i>	146
III.3. Impact des NTCMW bruts sur les paramètres sanguins (pO_2 , pCO_2 , pH et ctHb) des larves de <i>X. laevis</i>	148
III.4.Détermination des paramètres physico-chimiques du milieu d'exposition	150
III.5. Analyse de l'expression de gènes dans les érythrocytes de larves de <i>X. laevis</i> par qRT-PCR.....	151

IV. Discussion	155
V. Conclusion.....	164
Références bibliographiques	166
Discussion, conclusion générale et perspectives.....	172
Références bibliographiques	190

Liste des figures

Figure I.1 : Représentation d'un feuillet graphène; d'un NTC mono-paroi fermé par deux demi-fullerènes et du fullerène C60.....	17
Figure I.2 : Représentation schématique d'un nanotube de carbone mono-paroi, bi-paroi et multi-paroi.....	17
Figure I.3 : Evolution de la surface spécifique des NTC en fonction du nombre de parois et du diamètre.....	19
Figure I.4 : Estimation de l'évolution de la capacité de production mondiale de NTC.....	24
Figure I.5 : Observation en MET d'une coupe de feuille d' <i>Oryza sativa</i>	31
Figure I.6 : Sécrétion de mucus et adsorption de NTCSW à la surface de branchies de truites (<i>Oncorhynchus mykiss</i>).....	40
Figure I.7 : Transformations chimiques de l'oxygène moléculaire dans un système biologique.....	41
Figure I.8 : Schéma des défenses anti-oxydantes enzymatiques.....	43
Figure I.9 : Schéma de formation des produits « primaires » et « secondaires » de la peroxydation lipidique à partir de l'acide arachidonique.....	54
Figure I.10 : Formation de marqueurs pro-inflammatoires à partir de l'acide arachidonique	56
Figure II.1 : <i>Xenopus laevis</i> : couple d'adultes et œufs.....	71
Figure II.2 : Illustration de la métamorphose des larves de xénope jusqu'à l'obtention du stade juvénile en vue dorsale.....	71
Figure II.3 : Photographie en vue dorsale de larves de xénope au stade 50, 54 et en début de métamorphose	72
Figure II.4 : Anatomie générale d'une larve de <i>X.laevis</i>	73
Figure II.5 : Accouplement de xénopes adultes.....	74
Figure III.1 : Observation en MET d'échantillons de NTCMW bruts	85
Figure III.2 : Courbe étalon H ₂ O ₂	88
Figure III.3 : Courbe étalon BSA pour le dosage des protéines.....	89
Figure III.4 : Principe de dosage de la SOD.....	91
Figure III.5 : Courbe étalon du malondialdéhyde.....	93
Figure III.6 : Les trois types d'ADN observés par le test des Comètes.	96
Figure III.7 : Calcul du profil d'intensité de la comète	97
Figure III.8 : Résultat de toxicité aiguë (mortalité) chez les larves de Xénope après 96 h d'exposition statique aux NTCMW bruts	99
Figure III.9 : Induction d'activités enzymatiques du stress oxydant après exposition des larves de <i>X. laevis</i> à différentes concentrations de NTCMW bruts.....	102
Figure III. 10 : Induction d'activités enzymatiques du stress oxydant après exposition des larves de <i>X. laevis</i> à des NTCMW (0,1 mg/L) bruts ou dispersés	106
Figure III.11 : Concentration du MDA chez des larves de <i>X. laevis</i> exposées à des NTCMW bruts.....	107
Figure IV.1. : Boitier et sondes ODEON Ponsel	128

Figure IV.2 : Protocole de mesure des différents paramètres sanguins sur des larves de <i>X. laevis</i>	129
Figure IV.3 : Les phases de la PCR quantitative	131
Figure IV.4 : Représentation schématique de la puce C ₁ TM Single-Cell et des emplacements de pré-remplissage.....	137
Figure IV.5 : Représentation schématique de la structure des chambres réactionnelles d'une puce C ₁ TM	138
Figure IV.6 : Représentation schématique des différentes chambres réactionnelles de la puce C1 et des étapes successives permettant l'obtention de l'ADNc.	139
Figure IV.7 : Observations macroscopiques de la tête et de l'intestin de larves de xénope.	146
Figure IV.8 : Observations macroscopiques de la zone branchiale de larves de xénope	147
Figure IV.9 : Variations des paramètres physico-chimiques des milieux d'exposition contenant des NTCMW bruts.....	150
Figure IV.10 . Expression relative de gènes de réponse à l'apoptose, au stress oxydant, aux dommages à l'ADN, à la réponse inflammatoire et à l'hypoxie dans les cellules érythrocytaires de larves de <i>X. laevis</i>	154
Figure V.1 : Observations macroscopiques de la tête de larves au stade 54 exposées au NTCMW bruts pendant 24 h.	173
Figure V.2 : Schéma synthétique du potentiel mécanisme de toxicité des NTCMW bruts chez les larves <i>X. laevis</i>	187

Liste des tableaux

Tableau I.1 : Exemples d'applications de NTC existants actuellement et à venir dans un futur plus au moins proche.....	27
Tableau II.1 : Composition de l'eau reconstituée.....	76
Tableau III.1 : Caractérisation des nanotubes de carbone multi-parois Graphistrength®.	86
Tableau III.2 : Concentration de peroxyde d'hydrogène chez des larves de <i>Xenopus laevis</i> exposées à différentes concentrations de NTCMW bruts	100
Tableau III.3 : Concentration de peroxyde d'hydrogène chez des larves de <i>Xenopus laevis</i> exposées à des NTCMW bruts ou dispersés par la MO.....	104
Tableau III.4. : Résultats des essais Comètes sur les érythrocytes des larves de <i>X. laevis</i> exposées aux NTCMW bruts.	109
Tableau IV.1 : Composition de la solution ARN standard	133
Tableau IV.2 : Liste des amorces spécifiques des 25 gènes de <i>X. laevis</i> testés.....	134
Tableau IV.3 : Composition du Pre-Mix Sample pour puce BioMark.....	142
Tableau IV.4 : Concentration en métaux dans l'eau reconstituée après 24 h.	145
Tableau IV.5 : Différents paramètres sanguins chez les larves de de <i>X. laevis</i> exposées à différentes concentrations de NTCMW bruts.	149
Tableau V.1 : Variation de l'ensemble des paramètres impliqués dans l'état d'hypoxie	175

Liste des abréviations

$^1\text{O}_2$: oxygène singulet

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire

ADNmt : acide désoxyribonucléique mitochondriale

ADNn : acide désoxyribonucléique nucléaire

ARN : acide ribonucléique

ARNm : acide ribonucléique messenger

C60 : fullerènes

CAT : catalase

CCVD : dépôt chimique catalytique en phase vapeur (*catalytic chemical vapor deposition*)

CE₅₀ : Concentration efficace médiane

CI₅₀ : concentration inhibitrice médiane

CL₅₀ : concentration létale médiane

COX : cyclo-oxygénase

DEC : densité d'énergie cinétique

EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique

ER : Eau reconstituée

ERO : espèces réactives de l'oxygène

GA : gomme arabique

GPx : Glutathion peroxydase

GR : glutathion réductase

GSH ; glutathion réduit

GSSG : glutathion oxydé ou glutathion di-sulfite

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène

HCG : Hormone Chorionique gonadotrope

HNE : hydroxynonéal

LOEC : la plus petite concentration induisant un effet observé (Lowest Observed Effect Concentration)

LOX : lipoxgénases

LT : leucotriènes

MDA : malondialdéhyde

MET : microscopie électronique à transmission

MMS : methyl methanesulfonate

MO : matière organique

MS222 : Ethyl-3 benzoate méthanesulfonate

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduite

NM : nanomatériaux

NO[•] : monoxyde d'azote

NP : nanoparticule

NTC : Nanotubes de carbone

NTCDW ou DWCNT : nanotube(s) de carbone bi-paroi (double-walled carbon nanotube)

NTCMW ou MWCNT: nanotube(s) de carbone multi-paroi (multi-walled carbon nanotube)

NTCSW ou SWCNT : nanotube(s) de carbone mono-paroi (Single-Walled Carbon Nanotube)

O₂^{•-} : anion superoxyde

OH[•] : radical hydroxyle

ONOOH : acide peroxy nitreux

PF : poids frais

PG : prostaglandines

PMSF : phenylmethanesulfonyl fluoride

PMSG : gonadotrophine sérique équine (Pregnant Mare's Serum Gonadotropin)

pO_2 : pression partielle en dioxyde de carbone

pO_2 : pression partielle en oxygène

Prx : peroxyrédoxine

qPCR : réaction en chaîne par polymérase (polymerase chain reaction) quantitative

ROO^\bullet : radical peroxy

ROS : espèces réactives de l'oxygène (reactive oxygen species)

rpm : rotation par minute

RT : rétro-transcription

SOD : superoxyde dismutase

TBA : acide thio-barbiturique

TCA : acide trichloracétique

TMB : tetraméthylbenzidine

WST : sel de tétrazolium

Introduction générale

Les travaux présentés dans ce manuscrit de thèse ont été réalisés au sein du laboratoire EcoLab (laboratoire d'écologie fonctionnelle et environnement). Créé en 2007, ce laboratoire est issu de la formation d'une unité mixte de recherche (UMR 5245) du CNRS (Centre National de Recherche Scientifique), de l'UPS (Université Paul Sabatier) et de l'INPT (Institut National Polytechnique de Toulouse). Sa vocation est l'étude combinée du fonctionnement des communautés, des écosystèmes et de leurs interrelations. Le laboratoire de recherche EcoLab est composé de 5 Equipes dont l'équipe « Écotoxicologie et Santé des Écosystèmes » (ECSECO). Cette dernière développe depuis quelques années des protocoles d'évaluation de l'écotoxicité de contaminants environnementaux chez des organismes aquatiques modèles tels que l'amphibien *Xenopus laevis*. Le test micronoyau sur amphibien (évaluation de la génotoxicité) a d'ailleurs fait l'objet d'une normalisation au niveau national (AFNOR) et international (ISO, 2006) (Mouchet et al., 2011).

Par ailleurs, des travaux sont réalisés depuis 2007, en partenariat avec l'industriel Arkema-France. Cette collaboration offre entre autres, la possibilité d'étudier des nanoparticules industrielles puisque la société Arkema dispose d'un brevet et d'un pilote de production de nanotubes de carbone multi-parois (NTCMW) à l'échelle préindustrielle, sur le site de Lacq (Pyrénées Atlantiques). Cette collaboration a abouti à la création en 2010, du laboratoire commun Nautille (Nanotubes et Ecotoxicologie), premier laboratoire commun de recherche mixte public/privé dédié à l'étude de l'impact éco-toxicologique des nanotubes de carbone dans le compartiment aquatique (eau douce).

Dans ce contexte des travaux préliminaires ont été réalisés par Mouchet *et al.*, (Mouchet et al., 2005, 2007, 2008, 2010) sur des larves de xénope exposées à différentes concentrations de NTCMW sur une durée de 12 jours. Les résultats obtenus ont mis en évidence une inhibition de croissance malgré l'absence d'effets génotoxiques (essai des micronoyaux). Ils n'ont

toutefois pas permis de montrer le passage des nanoparticules carbonées à travers la barrière intestinale chez le xénope (spectrométrie RAMAN).

Ceci nous a conduits à suspecter un probable effet indirect des NTCMW sur les larves de xénope. Afin de répondre à cette problématique, les travaux engagés sur l'évaluation de la toxicité potentielle des nanotubes de carbone multi-parois chez les larves de xénope ont été poursuivis. L'objectif principal de ces travaux a été de tenter de mettre la lumière sur les différents mécanismes mis en place par les larves de xénope en réponse à une exposition à court-terme (24 h maximum) à des nanotubes de carbone multi-parois. Deux scénarios d'exposition ont été utilisés. Le premier prend en compte l'agglomération et la sédimentation des nanotubes de carbone (NTC) bruts dans l'eau. Le second tient compte de la présence, dans le milieu aquatique, de composés naturels tels que la matière organique, pouvant entraîner la persistance de nanotubes, plus ou moins individualisés, dans la colonne d'eau, et la modulation des réponses biologiques.

Un intérêt particulier a été accordé à la capacité des NTC à induire un stress oxydant chez les organismes qui y sont exposés et qui a été largement décrit dans la littérature (Ali et al., 2014; Folkmann et al., 2009; Pacurari et al., 2008; Shvedova et al., 2008, 2014). Ces nanoparticules ont en effet été identifiées comme étant à l'origine d'une production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Saria et al., 2014). Cependant, les mécanismes de génération des ERO par les NTC et l'importance relative de ce phénomène dans la toxicité ont été à ce jour très peu étudiés.

Au cours de ce travail de thèse, nous avons choisi d'étudier les effets d'une contamination aux NTCMW sur des larves de xénope et les relations qui existent entre le stress oxydant généré au cours des expositions et les effets observés. Du fait de la quasi inexistence de littérature concernant la réponse précoce d'organismes aquatiques à une exposition aux NTCMW, nous avons attaché une attention particulière à la détermination des effets de ces nanoparticules sur

des temps courts d'exposition en considérant plus particulièrement (i) l'induction d'une toxicité aiguë, (ii) l'évolution dans le temps de marqueurs du stress oxydant (production d'ERO, activités des enzymes anti-oxydantes, peroxydation lipidique et dommages à l'ADN) et (iii) l'identification de sources potentielles d'induction d'ERO. Le choix de l'organisme d'étude s'est naturellement porté sur l'amphibien *X. laevis*, une espèce de plus en plus utilisée en éco-toxicologie et pour laquelle le laboratoire possède une bonne expertise. De plus cette espèce a été choisie pour sa facilité d'élevage et de reproduction, l'abondance des larves obtenues à partir d'une seule ponte mais surtout pour sa sensibilité reconnue aux changements environnementaux (Gauthier, 1996).

Parallèlement à ces études, nous nous sommes intéressés à l'expression de gènes impliqués dans la réponse à une exposition aux NTCMW par une technique de RT-PCR quantitative innovante basée sur des mesures réalisées à l'échelle de cellules uniques.

Ce manuscrit divisé en quatre chapitres, débute par une introduction bibliographique qui présente les différentes structures et morphologies des nanotubes de carbone, les principales méthodes de synthèse et les propriétés mécaniques, électriques et chimiques hors du commun de ces nanoparticules. L'ensemble de ces informations permettra au lecteur de mieux comprendre pourquoi ces molécules font l'objet de travaux de recherche, qui rayonnent dans des domaines très variés, entraînant le développement exponentiel de leur production et leur application dans différents domaines, aboutissant à leur mise sur le marché.

La deuxième partie de ce chapitre se place dans un contexte socio-économique et aborde la dissémination et le devenir des nanotubes de carbone dans l'environnement et plus particulièrement dans le compartiment aquatique. Elle décrit un état de l'art des connaissances principales acquises en termes d'évaluation de l'écotoxicité des nanotubes de carbone sur différents organismes (microorganismes, végétaux, organismes terrestres et aquatiques). Une

attention particulière a toutefois été accordée aux organismes aquatiques, au sein desquels notre modèle d'étude, l'amphibien *Xenopus laevis* a été placé.

La troisième partie du « chapitre I » est consacrée aux connaissances actuelles sur les mécanismes de toxicité des nanotubes de carbone et notamment à leur aptitude d'adsorption et de translocation à travers différents organites cellulaires et compartiments de l'organisme. Nous évoquerons également la capacité des NTC à induire un stress oxydant chez les organismes qui y sont exposés ainsi que l'ensemble des mécanismes enzymatiques qui sont impliqués dans la réponse à ce déséquilibre de la balance d'oxydo-réduction (les superoxydes dismutases, la glutathion réductase et peroxydase, la catalase et les peroxyrédoxines). Nous finirons par la description de quelques travaux de la littérature consacrés à l'étude des dégâts oxydatifs cellulaires des nanotubes de carbone. Une attention particulière a été accordée aux dommages à l'ADN, à la peroxydation des lipides et à la réponse inflammatoire.

Le deuxième chapitre de ce manuscrit présente le modèle biologique utilisé dans le cadre de nos expérimentations avec une description des étapes de développement, du mode d'élevage des adultes reproducteurs et des larves. Nous avons également décrit dans ce chapitre la préparation des milieux utilisés pour l'exposition des larves de xénope aux nanotubes de carbone multi-parois, sous leur forme brute ou dispersée. Nous finirons par un paragraphe sur la gestion du matériel de laboratoire contaminé par les nanotubes de carbone.

Le chapitre III, occupe une place importante dans ce mémoire. En effet, en plus d'inclure le mode de production et la caractérisation des NTCMW utilisés, ce chapitre englobe l'ensemble des protocoles mis au point pour permettre l'évaluation des mécanismes de toxicité des NTC fournis par la société Arkema. Les résultats de l'évaluation de la toxicité aiguë des NTCMW sur des larves de xénope exposées à différentes concentrations (de 0 à 500 mg/L) sur des durée de 24, 48, 72 et 96 h y sont représentés. Ce chapitre inclut également l'ensemble des résultats concernant l'évaluation de la capacité des NTCMW bruts ou dispersés à induire un

stress oxydant chez les larves de *X. laevis*. Ainsi, les résultats de mesure de la production d'espèces réactives de l'oxygène (peroxyde d'hydrogène) et de l'induction d'enzymes de réponse au stress oxydant chez les larves exposées aux NTC sont inclus dans cette partie.

La deuxième partie de ce chapitre est consacrée aux conséquences de l'induction d'un stress oxydant chez les larves de xénope avec une attention particulière portée à la peroxydation des lipides (dosage du malondialdéhyde) et à l'induction des dommages à l'ADN (test des Comètes). La dernière partie de ce chapitre est consacrée à la discussion de l'ensemble des résultats obtenus.

Le quatrième et dernier chapitre de ce manuscrit n'est pas d'une importance moindre puisque l'ensemble des protocoles et des résultats de l'étude des voies potentiellement impliqués dans l'induction d'un stress oxydant chez les larves de xénope exposées aux NTCMW bruts y sont présentés. Ainsi, tous les protocoles utilisés pour l'identification des causes possibles d'un déséquilibre de la balance d'oxydoréduction chez les larves de xénope exposées aux NTCMW bruts ont été détaillés. Les résultats de ce chapitre peuvent être divisés en deux parties importantes. Une première relative à l'implication des paramètres physico-chimiques des milieux d'exposition dans l'induction d'un stress oxydant, à savoir, le relargage des métaux de synthèse, le pourcentage d'oxygène et le pH de l'eau. La seconde partie est essentiellement focalisée sur la mise en évidence d'une probable pénétration des NTC dans différents organes (branchies et intestin) par des observations macro- et microscopiques. Un éventuel colmatage des branchies est évalué par la mesure des paramètres sanguins (pression en oxygène et en gaz carbonique dans le sang, pH et concentration en hémoglobine), mais aussi par le dosage de l'expression de gènes impliqués dans la réponse à une hypoxie (*hif-1α*, *vegf*, *epo* et *hba1*).

Enfin, la dernière partie de ce chapitre a été consacrée à la présentation des essais de RT-PCR quantitative, réalisés dans le but de confirmer une partie des résultats obtenus dans les

chapitres III mais aussi de mettre la lumière sur d'autres voies connues pour être des conséquences directes d'un stress oxydant, comme l'apoptose et la réponse inflammatoire.

Ce manuscrit de thèse sera clôturé par une discussion générale qui regroupera l'ensemble des résultats obtenus dans le cadre de ce travail et leur comparaison avec ceux de la littérature.

Cette dernière partie permettra au lecteur de mieux comprendre les mécanismes mis en place par les larves de *X. laevis* en réponse à une exposition aux NTCMW de la société Arkema.

Références bibliographiques

- Ali, D., Ahmed, M., Alarifi, S., Ali, H., **2014**. Ecotoxicity of single-wall carbon nanotubes to freshwater snail *Lymnaea luteola* L.: Impacts on oxidative stress and genotoxicity. *Environ Toxicol.*
- Folkmann, J.K., Risom, L., Jacobsen, N.R., Wallin, H., Loft, S., Møller, P., **2009**. Oxidatively damaged DNA in rats exposed by oral gavage to C60 fullerenes and single-walled carbon nanotubes. *Environ Health Perspect.* 117, 703–708.
- Gauthier, L., **1996**. The amphibian micronucleus test, a model for in vivo monitoring of genotoxic aquatic pollution. *Alytes.* 14, 53–84.
- Mouchet, F., Gauthier, L., Mailhes, C., Jourdain, M.J., Ferrier, V., Devaux, A., **2005**. Biomonitoring of the genotoxic potential of draining water from dredged sediments, using the comet and micronucleus tests on amphibian (*Xenopus laevis*) larvae and bacterial assays (Mutatox and Ames tests). *J. Toxicol Environ Health Part A.* 68, 811–832.
- Mouchet, F., Landois, P., Flahaut, E., Pinelli, E., Gauthier, L., **2007**. Assessment of the potential *in vivo* ecotoxicity of Double-Walled Carbon Nanotubes (DWNTs) in water, using the amphibian *Ambystoma mexicanum*. *Nanotoxicology.* 1, 149–156.
- Mouchet, F., Landois, P., Sarremejean, E., Bernard, G., Puech, P., Pinelli, E., Flahaut, E., Gauthier, L., **2008**. Characterisation and *in vivo* ecotoxicity evaluation of double-wall carbon nanotubes in larvae of the amphibian *Xenopus laevis*. *Aquat Toxicol.* 87, 127–137.
- Mouchet, F., Landois, P., Puech, P., Pinelli, E., Flahaut, E., Gauthier, L., **2010**. Carbon nanotube ecotoxicity in amphibians: assessment of multiwalled carbon nanotubes and comparison with double-walled carbon nanotubes. *Nanomedicine-UK.* 5, 963–974.
- Mouchet, F., Landois, P., Datsyuk, V., Puech, P., Pinelli, E., Flahaut, E., Gauthier, L., **2011**. International amphibian micronucleus standardized procedure (ISO 21427-1) for in vivo evaluation of double-walled carbon nanotubes toxicity and genotoxicity in water. *Environ Toxicol.* 26, 136–145.
- Pacurari, M., Yin, X.J., Zhao, J., Ding, M., Leonard, S.S., Schwegler-Berry, D., Ducatman, B.S., Sbarra, D., Hoover, M.D., Castranova, V., Vallyathan, V., **2008**. Raw single-wall carbon nanotubes induce oxidative stress and activate MAPKs, AP-1, NF-kappaB, and Akt in normal and malignant human mesothelial cells. *Environ Health Perspect.* 116, 1211–1217.
- Saria, R., Mouchet, F., Perrault, A., Flahaut, E., Laplanche, C., Boutonnet, J.-C., Pinelli, E., Gauthier, L., **2014**. Short term exposure to multi-walled carbon nanotubes induce oxidative stress and DNA damage in *Xenopus laevis* tadpoles. *Ecotox Environ Safe.* 107, 22–29.
- Shvedova, A.A., Kisin, E., Murray, A.R., Johnson, V.J., Gorelik, O., Arepalli, S., Hubbs, A.F., Mercer, R.R., Keohavong, P., Sussman, N., Jin, J., Yin, J., Stone, S., Chen, B.T., Deye, G., Maynard, A., Castranova, V., Baron, P.A., Kagan, V.E., **2008**. Inhalation vs. aspiration of single-walled carbon nanotubes in C57BL/6 mice: inflammation, fibrosis, oxidative stress, and mutagenesis. *Am J Physiol Lung Cell Mol. Physiol.* 295, 552–565.

Shvedova, A.A., Kisin, E.R., Murray, A.R., Mouithys-Mickalad, A., Stadler, K., Mason, R.P., Kadiiska, M., **2014**. ESR evidence for in vivo formation of free radicals in tissue of mice exposed to single-walled carbon nanotubes. *Free Radical Bio Med.* 73, 154–165.

Chapitre I : introduction bibliographique

I. Généralités sur les nanotubes de carbone

I.1. Définition des nanomatériaux

La commission européenne définit un nanomatériau (NM) comme « un matériau formé accidentellement ou manufacturé contenant des particules libres, sous forme d'agrégats ou d'agglomérats dont au moins 50% des particules, dans la répartition numérique par taille, présentent une ou plusieurs dimensions externes se situant entre 1 et 100 nm » (Janez, 2011).

Une « particule » correspond à « un minuscule fragment de matière possédant des contours physiques bien définis ». Les particules peuvent être soudées ou fusionnées (liaisons fortes) pour former une autre particule dénommée « agrégat ». Enfin, un amas friable de particules ou d'agrégats dont la surface externe globale correspond à la somme des surfaces de ses constituants individuels est identifié comme étant un « agglomérat ». Ces particules sont liées par des forces d'intensité plus faibles (*e.g.* Van der Waals, forces électrostatiques) (Oberdörster et al., 2005).

I.2. Structure et morphologie des nanotubes de carbone

Depuis leur découverte par Iijima en 1991 (Iijima, 1991), les nanotubes de carbone (NTC) suscitent un grand intérêt scientifique du fait de leurs propriétés exceptionnelles.

Le diamètre moyen des NTC varie du nanomètre (NTC mono-paroi) à quelques dizaines de nanomètres (NTC multi-parois) et leur longueur de quelques microns à quelques centaines de microns (pouvant atteindre le centimètre dans certains cas (Huang et al., 2006; Zheng et al., 2004)).

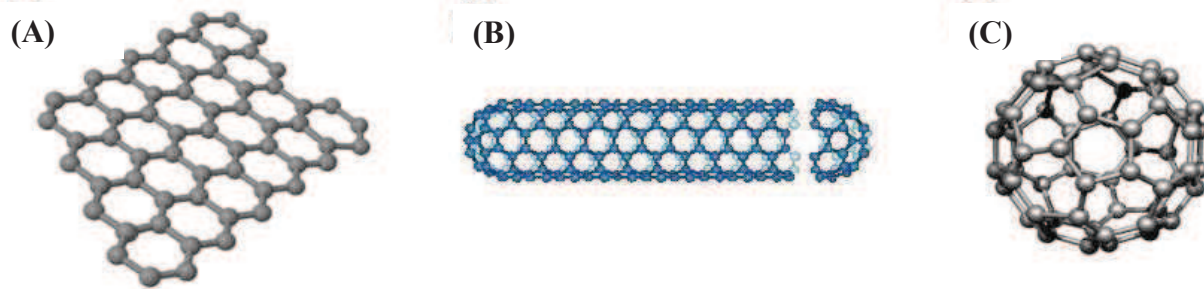


Figure I.1 : Représentation d'un feuillet graphène (A); d'un NTC mono-paroi fermé par deux demi-fullerènes (B); du fullerène C60 (C).

Il est possible de décrire simplement la structure d'un NTC comme un feuillet de graphène (**figure I.1.A**) enroulé sur lui-même, formant un cylindre creux (**figure I.1.B**) fermé à ses extrémités par des demi-fullerènes ou des structures plus complexes [exemple de fullerène : C60], (**figure I.1.C**).

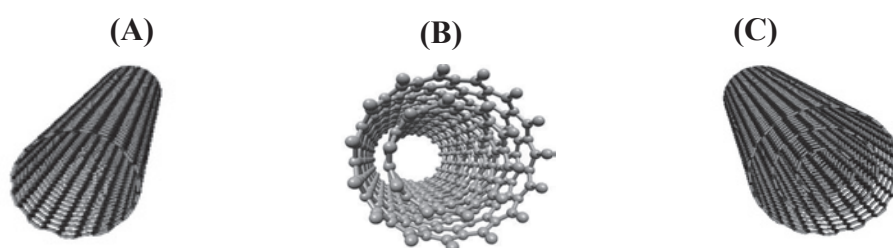


Figure I.2 : Représentation schématique d'un nanotube de carbone mono-paroi (A) bi-paroi (B) ou multi-paroi(C).

Selon le nombre de parois, on distingue deux types de NTC. Les NTC dits mono-paroi (NTCSW) ou SWCNT pour "*single-walled carbon nanotubes*" (**figure I.2.A**), sont constitués d'un seul feuillet de graphène enroulé sur lui-même, dont le diamètre varie habituellement

entre 1 et 3 nm. Bethune *et al*, (Bethune et al., 1993) ainsi que Iijima et Ichihashi (Iijima and Ichihashi, 1993) ont été les premiers à rapporter leur synthèse.

Les NTC dits multi-parois (NTCMW) ou MWCNT pour "*multi-walled carbon nanotubes*" (**figure I.2.B**), sont constitués de plusieurs feuillets (2 à 50) de graphène arrangés en cylindres concentriques. Les NTC multi-parois regroupent également les nanotubes biparois (NTCDW) ou encore appelés DWCNT (*double-walled carbon nanotubes*). Ces derniers forment un groupe particulier car, comme leur nom l'indique, ils sont constitués de seulement deux parois concentriques et sont donc à l'interface entre les SWCNT et les MWCNT.

I.3. Propriétés des nanotubes de carbone

Les NTC présentent généralement une grande surface spécifique, pouvant atteindre théoriquement 1310 m²/g pour des NTCSW fermées et isolés. En pratique, les NTC sont souvent regroupés en faisceaux et contaminés par des sous-produits de synthèse, conduisant à des valeurs de surfaces spécifiques plus modestes. L'augmentation du nombre de parois et à un moindre degré celle du diamètre, conduit aussi à une diminution de la surface spécifique des NTC (**Figure I.3**) (Peigney et al., 2001). De par leur structure, leur taille et leur composition, les nanotubes de carbone possèdent des propriétés exceptionnelles.

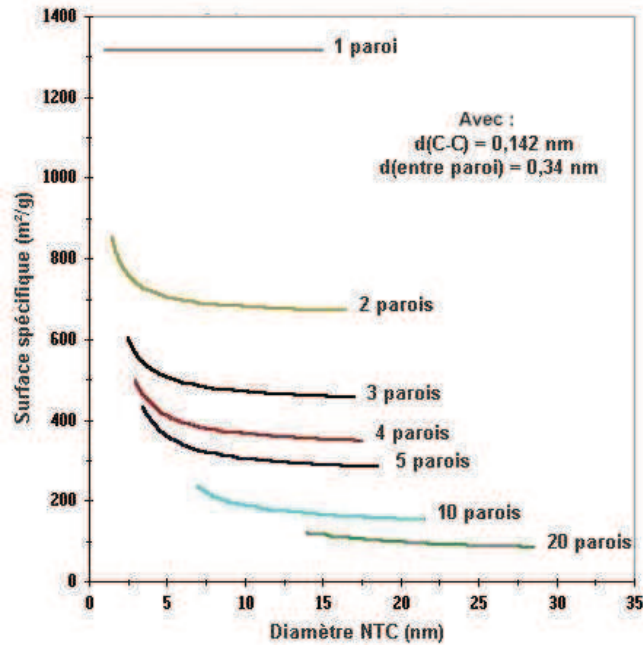


Figure I.3 : Evolution de la surface spécifique des NTC en fonction du nombre de parois et du diamètre (Peigney et al., 2001).

I.3.1. Propriétés mécaniques

Les nanotubes de carbone possèdent de nombreuses propriétés mécaniques. Parmi ces dernières nous pouvons citer leur rigidité que l'on peut comparer à celle de l'acier tout en restant extrêmement légers. Une autre propriété qui fait l'exception de ces matériaux est leur dureté et leur conductivité thermique comparables voire supérieures, dans le cas des NTCSW, à celle du feuillet de graphène ou du diamant de haute pureté (Savas, 2000). Les NTC peuvent également être très flexibles (environ 200 fois plus que l'acier pour un poids 6 fois inférieur) et ceci réversiblement, sans détérioration, jusqu'à un angle d'environ 110° pour des NTCSW (Iijima et al., 1996).

I.3.2. Propriétés électriques

Du fait de la faible diffusion des électrons et de leur grande stabilité à haute température (jusqu'à 250°C sous air et 1500°C sous vide), les NTC peuvent supporter des densités de

courant extrêmement élevées (jusqu'à 3 ordres de grandeur plus importants que celle du cuivre) (Yao et al., 2000). De plus, en fonction de leur géométrie (diamètre du tube et l'angle d'enroulement du feuillet de graphène), les NTC ont la particularité, tout à fait exceptionnelle, de pouvoir être semi-conducteurs ou métalliques (Miaudet, 2007). Par ailleurs, les nanotubes de carbone possèdent une grande mobilité des électrons sous l'effet d'un champ électrique : $100\,000\text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à 300 K. Il est également important de noter que ces nanoparticules présentent le grand avantage d'être supraconducteurs à basse température.

I.3.3. Propriétés chimiques

Les nanotubes sont des structures creuses, que l'on peut remplir avec d'autres composés chimiques, ce qui en fait des récipients clos à l'échelle nanométrique, appelés « nanofils ».

Les nanotubes de carbone sont relativement peu réactifs et une modification chimique de leur surface fait souvent appel à des espèces fortement réactives (*eg.* oxydants forts, réducteurs forts, espèces). C'est pourquoi une chimie de greffage de nanotubes basée sur des interactions non covalentes s'est fortement développée ces dernières années (adsorption de tensioactifs, enroulement de polymères, d'ADN, adsorption de pyrènes, *etc.*) (Hirsch, 2002).

I.3.4. Propriétés optiques

Le matériau le plus noir jamais conçu par l'homme est un tapis de nanotubes disposés verticalement, réalisé par des chercheurs de l'Université Rice autour du professeur Pulickel Ajayan (Cao et al., 2005); avec un indice de réflexion de 0,045 %. Ce matériau est 30 fois plus sombre que le carbone, ce qui lui permet d'absorber 99,95 % de la lumière qu'il reçoit. Cette capacité d'absorption est trois fois supérieure à celle de l'alliage nickel-phosphore qui était le matériau réputé le plus sombre.

Les propriétés optiques singulières des NTC ont été mises au service d'un système d'émission de lumière infrarouge par des nanotubes de carbone semi-conducteurs placés dans une géométrie de transistor (Barone et al., 2005).

Il est important de noter que, les propriétés exceptionnelles des NTC ont tendance à se dégrader lorsque le nombre de parois augmente, pour tendre progressivement vers celles du graphite.

I.4. Synthèse des nanotubes de carbone

Les NTC peuvent être synthétisés selon trois méthodes principales : l'arc électrique, l'ablation laser et le dépôt chimique catalytique en phase vapeur (CCVD). Ces voies de synthèse ont en commun la nécessité de disposer d'une source de carbone, d'énergie apportée sous forme de chaleur et éventuellement de pression et d'un catalyseur. Il existe également d'autres méthodes plus particulières (*e.g.* combustion d'hydrocarbures, ablation solaire, synthèse électrochimique).

I.4.1. Méthode de synthèse par arc électrique

L'arc électrique est la méthode historique pour la synthèse des NTC. Cette méthode était initialement une voie de synthèse des fullerènes, elle a été modifiée par la suite pour produire des NTC (Iijima, 1991, Ebbesen and Ajayan, 1992). La technique consiste en la décharge d'un arc électrique entre deux électrodes de graphite. Dans le cas où les électrodes sont en graphite pur, des NTCMW sont préparés (Ebbesen et al., 1993). Il est possible d'utiliser une anode en graphite contenant un métal, jouant le rôle de catalyseur et d'obtenir ainsi des NTCSW (Iijima and Ichihashi, 1993). Le catalyseur le plus employé est à base de nickel (Ni) et de yttrium (Y) (Journet et al., 1997). Les échantillons de NTC obtenus par cette voie sont contaminés par des nanoparticules métalliques, des fullerènes, des particules de

graphite et du carbone amorphe. Ils contiennent généralement au mieux 30% de NTC. Pour éliminer ces contaminants, des purifications poussées sont nécessaires mais elles endommagent les NTC et les rendements obtenus sont finalement relativement faibles.

I.4.2. Méthode de synthèse par ablation laser

L'ablation laser constitue une autre voie de synthèse des NTC par vaporisation d'une cible de graphite par un faisceau laser. Les NTCMW sont synthétisés à partir d'une cible en graphite pur alors que les NTCSW peuvent être obtenus à partir d'une cible en graphite contenant également des métaux (par exemple : Co/Ni, Co, Ni, Co/Pt, Ni/Pt, Co/Cu). Le rendement et la qualité des échantillons sont meilleurs que dans le cas de l'arc électrique (Guo et al., 1995, Thess et al., 1996). Cette méthode présente cependant deux inconvénients majeurs : son coût et la difficulté de contrôle des paramètres expérimentaux.

I.4.3. Méthode de synthèse par dépôt chimique catalytique en phase vapeur (CCVD)

Cette technique vise à décomposer un flux gazeux contenant une source de carbone (*e.g.* hydrocarbure ou monoxyde de carbone) sur des nanoparticules catalytiques. Ces derniers peuvent être obtenues par décomposition d'un précurseur organométallique (Schneider et al., 2000), par réduction d'un précurseur imprégné sur un support (Jason H. Hafner, 1998) ou par réduction sélective d'une solution solide (Govindaraj et al., 1999; Peigney et al., 1997). De nombreux paramètres (température, durée de traitement, composition du flux gazeux, débit des gaz, nature et composition du catalyseur...) jouent sur la nature des espèces carbonées produites. Les NTC ont d'abord été synthétisés par décomposition de l'acétylène (Hernadi et al., 1996, Yacaman et al., 1993). D'autres sources de carbone sont également utilisées pour synthétiser des NTC comme le méthane (CH_4) (Peigney et al., 1997), le monoxyde de carbone (CO) (Dai et al., 1996), le benzène (C_6H_6) (Díaz et al., 1998) ou l'éthanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) (Cele

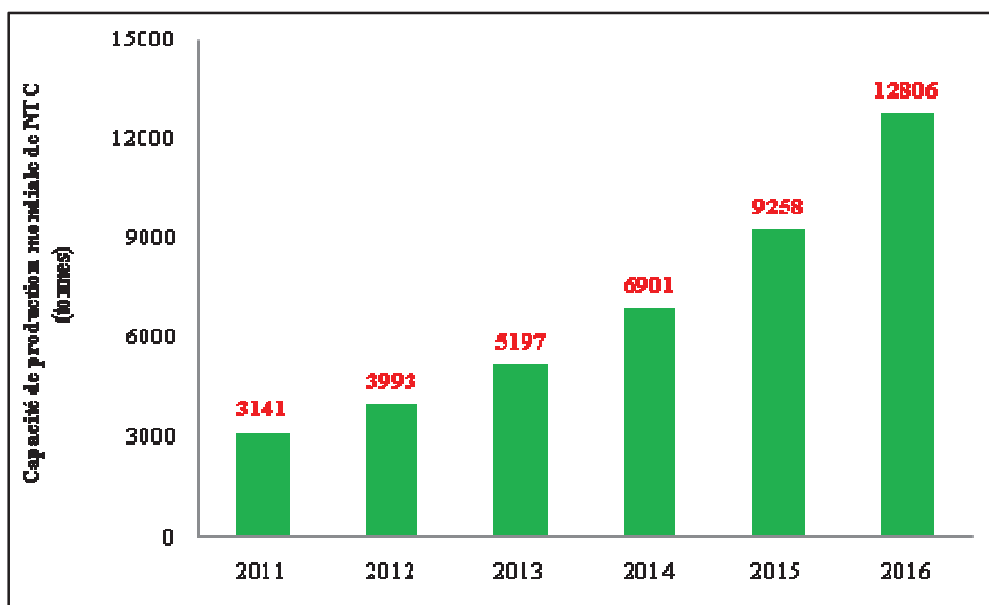
and Coville, 2009). La CCVD se distingue des deux autres techniques (dites à "haute température") par ses nombreux avantages, notamment un meilleur contrôle des conditions opératoires, sa facilité de mise en œuvre, son faible coût et la possibilité de travailler facilement à grande échelle. C'est la technique principale pour la synthèse industrielle de NTC.

Lors de la synthèse des NTC, le principe de croissance du nanotube repose sur la décomposition de la source carbonée à la surface des particules catalytiques. Le carbone ainsi produit diffuse à la surface et/ou à l'intérieur des nanoparticules (NP) et finit par précipiter une fois les particules saturées en carbone (*i.e.* atteinte de la limite de solubilité) (Grüneis et al., 2006). Cette condensation conduit à la formation d'une calotte de graphène, qui vient coiffer le dessus des particules. Le carbone continuant à diffuser à l'intérieur et/ou à la surface des particules, ce chapeau carboné est expulsé de la particule en même temps que la paroi cylindrique d'un NTCSW se forme et croît. Un ou plusieurs chapeaux peuvent également se former sous le premier avant qu'il soit expulsé. Il y aura dans ce cas croissance de NTCMW sur le substrat.

I.5. Production et applications des nanotubes de carbone

I.5.1. La production mondiale des nanotubes de carbone

A ce jour, nous pouvons répertorier une centaine de groupes produisant des NTC, mais leur nombre pourrait être supérieur à 200 dans les cinq prochaines années (Patel, 2011). On recense également environ 1000 sociétés et institutions activement engagées dans la recherche et le développement de NTC (Patel, 2011).



***Figure I.4 :** Estimation de l'évolution de la capacité de production mondiale de NTC (Patel, 2011).*

Le marché mondial des NTC est dominé par quelques fournisseurs opérant dans de multiples secteurs d'activité et localisés principalement en Asie (44% en 2010), aux États-Unis (29% en 2010) et en Europe (24%). La capacité de production mondiale a considérablement augmenté ces cinq dernières années, franchissant les 2500 tonnes en 2010 et pouvant atteindre 13000 tonnes en 2016 (**figure I.4**) (V. Patel, 2011).

La plupart des compagnies produisant les NTC à l'échelle industrielle ont focalisé la production et le développement de leur équipement sur la synthèse par CCVD (83% de la production mondiale en 2010) et particulièrement celle des NTCMW. C'est le cas de Bayer Material Science ou Nanocyl, mais également d'Arkema-France qui a développé la production de NTCMW Graphistrength® en mettant au point un pilote (production de 10

tonnes/an) en Février 2006, puis une unité industrielle dont la capacité de production atteint 400 tonnes/an (Bordere et al., 2011).

La société de conseil D&Consultants, mandatée par la Direction Générale de la Compétitivité de l'Industrie et des Services (DGCIS), a mené une étude auprès des entreprises françaises identifiées comme possédant une activité dans les NM (D&Consultants, 2012). Ainsi en 2010, 11% des entreprises productrices de NM recensées se positionnaient sur la production de nano-fibres et de nanotubes de carbone, ce qui représente plusieurs dizaines de tonnes produites par an pour un budget d'environ 100 M€.

I.5.2. Les domaines d'application des nanotubes de carbone

Les nanotechnologies apparaissent comme les technologies émergentes de ce siècle et pourraient être à l'origine d'une véritable révolution industrielle. Les NTC se démarquent des différentes NP du fait de leur affiliation structurale avec le graphite, ainsi que par leur forme tubulaire et leur diamètre nanométrique, ce qui leur permet de combiner des propriétés mécaniques, électriques, thermiques, magnétiques et optiques (**voir paragraphe I.3**). Les domaines d'application touchent principalement les industries plastiques et composites (69% du marché mondial en 2010 (V. Patel, 2011)) qui exploitent leurs propriétés exceptionnelles de résistance à la déformation, de flexibilité et de dureté mais aussi leur conductivité thermique hors norme (**voir paragraphe I.3**).

Les secteurs électriques et électroniques occupent la seconde place, avec 10% du marché mondial des NTC en 2010 (V. Patel, 2011). Les propriétés de comportement métallique et/ou semi-conducteur des NTC (NTCSW et NTCMW) en font de parfaits candidats pour l'élaboration de composants électroniques (Seichepine et al., 2012; Tinguely, 2012), tels que les diodes et les transistors, dont les performances seraient supérieures à celles du silicium.

Le secteur de l'énergie représentait, quant à lui, 8% du marché mondial des NTC en 2010 (Patel, 2011). Ces nanoparticules seraient en effet propices au stockage de gaz et d'énergie (électrode de batteries et de super-condensateurs). Par ailleurs, des recherches sont également conduites pour l'élaboration des pales d'éoliennes, de cellules photovoltaïques, *etc*, à partir de NTC.

Les autres domaines d'applications comprennent la médecine (*e.g.* système d'administration ciblée de médicaments (Sanz et al., 2011), imagerie et ingénierie tissulaire (Bédier et al., 2012), traitement de cancers (Neves et al., 2012)), le traitement de l'eau et des sols (*e.g.* membranes de filtration, absorbants de polluants pour la bioremédiation) et plus généralement les capteurs chimiques.

Le **tableau I.1** représente les applications intégrant des NTC, parmi lesquelles figurent des produits de consommation courante déjà présents sur le marché, ainsi que les prochaines générations de produits.

Tableau I.1 : Exemples d'applications de NTC existants actuellement (liste non exhaustive) et à venir dans un futur plus au moins proche (Morinobu et al., 2008, Patel, 2011; Woodrow Wilson International Center for Scholars)

Présent	<ul style="list-style-type: none"> - Articles de sport : raquettes de tennis, battes de baseball, clubs de golf, planches de surf, cross de hockey, pièces de vélo, kayak ; - Aéronautique et Automobiles : ailes d'avion, trains d'atterrissage des hélicoptères, systèmes de transport de carburant à dissipation électrostatique ; - Electrique et Electronique : films transparents conducteurs, écrans OLED (prototypes), pointes de sondes à balayage, capteurs ; - Energie : pales d'éoliennes, électrodes de batterie ; - Médecine : équipements spécialisés (e.g. cathéters, membranes de filtration) ;
Futur proche (< à 5 ans)	<ul style="list-style-type: none"> - Electrique et Electronique : nanosystèmes électromécaniques (NEMS), électrodes de supercondensateurs, écrans à émission de champs, écrans LCD ou OLED, sources de rayons-X - Energie : électrodes de piles à combustibles, de stockage et d'hydrogène, système de régulation thermique - Capteurs biologiques - Encres d'impression, adhésifs
Futur lointain (> à 5 ans)	<ul style="list-style-type: none"> - Electrique et Electronique : câbles de transport d'électricité, conducteurs en micro-électronique, composants électroniques flexibles, transistors à effets de champs - Aéronautique et Automobile : composites - Energie : dispositifs photovoltaïques - Médecine : systèmes d'administration ciblée de médicaments

II. Ecotoxicité des nanotubes de carbone

II.1. Etat de l'art

Les NTC constituent une innovation et un enjeu économique majeurs. Ils disposent d'importantes propriétés qui rendent leurs applications nombreuses et variées. Malgré une production croissante de ces nanoparticules au cours de ces dernières années, leurs conséquences sur la santé humaine et celle de notre environnement restent à ce jour mal explorées et constituent une réelle préoccupation de nos sociétés industrialisées. La présence et l'utilisation de ces nanoparticules carbonées dans un grand nombre de produits du quotidien (**paragraphe I.5.2**) constituent un danger potentiel pour la santé de notre environnement.

En effet, la production des NTC, leur utilisation et donc leur usure *via* des processus photochimiques et mécaniques [irradiation par UV A/B et abrasion (Nowack et al., 2012)] ou encore leur traitement en tant que déchets (enfouissement, incinération, recyclage) (Gottschalk et al., 2009) favorisent leur dissémination potentielle dans tous les compartiments de l'environnement (*i.e.* eau, sol, air). Leurs voies d'entrée potentielles peuvent être liées à des sources de contaminations ponctuelles (*e.g.* usine de production, zone d'enfouissement, effluents d'eaux usées) ou diffuses (*e.g.* dégradation des produits pendant leur utilisation, ruissellement des eaux de pluie, crues, dépôts humides atmosphériques) (Wiesner et al., 2006). Ces nanoparticules peuvent ainsi rejoindre le compartiment aquatique, bien connu pour être le réceptacle principal de la majorité des polluants (Lovern et al., 2007).

II.2. Etude de l'écotoxicité des NTC sur différents organismes

Alors que les NTC ont été découverts il y a plus d'un demi-siècle, la toxicité potentielle induite par ces nanoparticules carbonées n'est évaluée que depuis une dizaine d'années. La majorité de ces travaux est toutefois portée sur l'impact toxicologique des NTC relatif à l'homme avec des études *in vitro* réalisées sur des modèles cellulaires (Muller et al., 2008,

Simon-Deckers et al., 2008, Barillet et al., 2010, Palomäki et al., 2011;) et *in vivo* menées sur des organismes modèles [*e.g.* rats (Masato Naya, 2012; Muller et al., 2012), souris (Shvedova et al., 2008)]. Cependant, encore à ce jour, peu d'études relevant réellement de l'écotoxicologie des nanotubes de carbone sont disponibles. Parmi elles, la plupart concernent le fullerène (C60). Ces études mettent en évidence l'ingestion du C60 et sa toxicité associée chez plusieurs organismes modèles : crustacés d'eau douce (*Daphnia magna* et *Hyaella azteca*), copépodes marins et poissons (*Pimephales promelas*, *Oryzias latipes*, *Danio rerio*, *Micropterus salmoides*) (Oberdörster, 2004, Lovern and Klaper, 2006; Oberdörster et al., 2006, Zhu et al., 2006, Lovern et al., 2007, Zhu et al., 2007b, Usenko et al., 2008).

La présente synthèse a pour objectif de réaliser un état de l'art des connaissances disponibles concernant les effets écotoxiques des NTC chez divers organismes. Une attention particulière sera accordée aux NTC multi-parois (NTCMW). D'autres types de NTC (mono-paroi -NTCSW- et bi-parois -NTCDW-) dont la réactivité de surface est semblable aux NTCMW, bien que la morphologie soit généralement significativement différente, seront aussi mentionnés succinctement afin de compléter cet état de l'art.

II.2.1. Impact des NTC sur les micro-organismes

La toxicité des NTC multi-parois et mono-parois a été testée sur différentes souches bactériennes (Gram positif et Gram négatif). Les effets les plus marqués ont été observés pour les NTCSW. Ces derniers étaient en effet capables d'inactiver le plus fort pourcentage de cellules dans les cultures d'*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermis* ainsi que dans des communautés microbiennes présentes dans les fleuves et dans les effluents d'eaux usées. L'ajout de matières organiques (MO) naturelles à des concentrations élevées avait entraîné une diminution de l'adhésion des NTCSW sans pour autant réduire leur toxicité. En revanche en présence de NTCM dans le milieu, une activité

antibactérienne plus modérée a été observée (Kang et al., 2009). Des études réalisées sur le protozoaire cilié *Tetrahymena pyriformis* avec des NTCMW bruts ou fonctionnalisés, avaient mis en évidence le rôle de la fonctionnalisation des NTC. En effet les NTC modifiés par la glucosamine avaient stimulé la croissance du protozoaire avec un effet de dose. Au contraire, une fonctionnalisation des NTC par la décylamine, a abouti à une inhibition de la croissance cellulaire (Guo et al., 2008). D'autres travaux visant à évaluer l'impact des NTCSW sur le protozoaire, *Tetrahymena thermophila* (espèce importante dans le traitement des eaux usées et un bon indicateur de la qualité des effluents) avaient mis en évidence l'apparition de quatre symptômes : réduction de la mobilité, agrégation cellulaire, accumulation de la matrice extracellulaire et mort cellulaire au-delà de 7 µg/mL (Ghafari et al., 2008).

Long *et al.*, avaient démontré qu'une exposition de l'algue verte *Chlorella* sp. à une concentration de 100 mg/L de NTCMW pendant une durée de 96 h était à l'origine d'une inhibition de croissance (Long et al., 2012). Par ailleurs, des expérimentations menées sur la souche bactérienne *Escherichia coli*, exposée à des concentrations allant jusqu'à 8 µg/mL de NTCMW ne montraient aucun effet de toxicité (Roy et al., 2012).

II.2.2. Impact des NTC sur les végétaux

Une étude *in vitro* sur les cellules d'*Arabidopsis* T87 avait montré que des NTCMW, sous forme d'agrégats de tailles différentes, étaient à l'origine d'une toxicité qui différait en fonction du diamètre moyen des agrégats. En effet, les échantillons les moins agrégés étaient les plus toxiques avec des effets inhibiteurs sur la viabilité cellulaire, la quantité de chlorophylle et l'activité superoxyde dismutase. Les auteurs avaient émis l'hypothèse d'une probable activation des signaux d'hypersensibilité pour les faibles doses de NTCMW et de la mort cellulaire pour les concentration les plus élevées (Lin et al., 2009a).

Dans le but d'étudier la transmission générationnelle des nanoparticules, des graines de riz *Oryza sativa* avaient été prétraitées avec des NTCMW, suspendus dans une solution de MO à des concentrations allant jusqu'à 800 mg/L. Après avoir laissé les plantes, atteindre une taille de 6 cm, des observations microscopiques avaient été réalisées. Ces dernières ont mis en évidence la présence de quelques agrégats dans le système vasculaire (**figure I.5**) mais pas dans les tissus de la plante (Lin et al., 2009b). En revanche, lorsque des graines de moutarde ou de tomate ont été mises à germer en présence de NTCMW bruts ou oxydés, les NTC avaient pénétré dans les téguments des graines mais aussi dans les tissus des racines (Khodakovskaya et al., 2009; Mondal et al., 2011). Chez la tomate, les nanotubes avaient augmenté la vitesse de germination et de croissance qui étaient plus importantes sur les terrains enrichis en NTCMW par rapport au contrôle (Khodakovskaya et al., 2009)

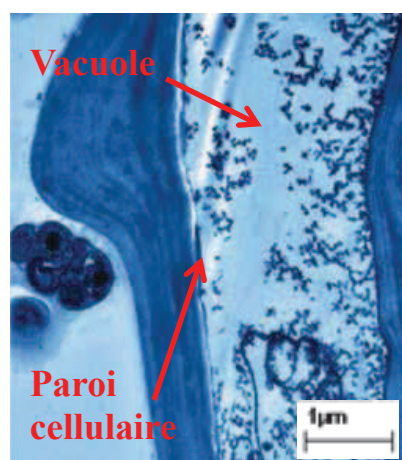


Figure I.5 : Observation en MET d'une coupe de feuille d'*Oryza sativa* dont les graines ont été exposées aux NTCMW où apparaît l'incorporation des particules de C_{70} dans la vacuole et la paroi cellulaire (Lin et al., 2009a).

Dans une étude récente, l'absorption des NTCMW marqués au C_{14} a été quantifiée dans le blé *Triticum aestivum* et le colza *Brasica napus*. Les résultats ont montré que moins de 0,05

‰ de la concentration initiale en NTC a été absorbée par les racines et les feuilles (Larue et al., 2012).

Des travaux visant à évaluer l'impact des NTCSW bruts ou modifiés avec l'acide poly-3-aminobenzène sulfonique sur six différents types de végétaux (choux, carottes, concombre, salade, oignon et tomate) ont montré que la croissance des racines a été plus affectée en présence de NTC bruts. Ces derniers ont été capables d'inhiber l'élongation des racines chez la tomate et au contraire de la stimuler chez le concombre et l'oignon. La carotte et le chou n'ont quant à eux pas été affectés par l'exposition aux NTCSW. Les effets observés ne sont pas dûs à une internalisation des nanotubes dans les plantes, mais aucune autre hypothèse n'a été formulée (Cañas et al., 2008).

II.2.3. Impact des NTC sur les organismes terrestres

En ce qui concerne l'impact des NTC sur les invertébrés terrestres, très peu d'études existent à ce jour. Des essais de toxicité sublétales ont été réalisés sur le ver de terre *Eisenia veneta* exposé pendant 28 jours à des NTCDW (Scott-Fordsmand et al., 2008). Des concentrations allant jusqu'à 495 mg/kg d'aliment sec n'ont pas affecté la viabilité ni réduit le poids des vers. Cependant à partir de la concentration de 37 mg/kg d'aliment sec le nombre de cocons a diminué de 10% laissant penser que les NTCDW pourraient impacter la reproduction des vers de terre (Scott-Fordsmand et al., 2008).

Une étude comparative chez la mouche *Drosophila melanogaster* visant à évaluer l'effet potentiel de différentes nanoparticules carbonées (C60, noir de carbone, NTCSW et NTCMW) n'a mis en évidence aucun effet lorsque l'exposition (contamination par la nourriture) a eu lieu au stade larvaire, malgré une contamination évidente des organismes. En revanche, la contamination directe des adultes a montré que les différences d'adhérence des nanoparticules (plus marquées pour le noir de carbone et les NTCSW) pouvaient conduire à

différents effets. L'adhésion des NTC (essentiellement le noir de carbone) au corps des mouches a ainsi réduit leur comportement de toilettage, leur fonction locomotrice et induit une mortalité dans les cas extrêmes (Liu et al., 2009).

En ce qui concerne les vertébrés terrestres, aucune étude n'a été réalisée à ce jour sur des espèces sauvages. Par contre, de nombreux travaux ont utilisé les rongeurs comme modèle, avec une exposition aux NTC généralement par inhalation ou par injection (Aschberger et al., 2010; Van der Zande et al., 2011).

La toxicité des NTC sur la reproduction a été testée sur des souris CD-1 ayant ingérées 10 mg/kg de NTCSW dispersés à la gomme adragante et ceci au 9^{ème} jour de gestation. Les résultats obtenus ont montré une apparition de défauts morphologiques et des anomalies du squelette sans effet sur la taille de la portée ou sur le poids de la mère ou de ses descendants. Des concentrations dix fois plus importantes (100 mg/kg) n'ont provoqué aucun effet indésirable. Les auteurs attribuent cette absence de toxicité à l'agglomération des NTC dans la solution de gavage (Philbrook et al., 2011). Dans une étude chez le rat Sprague-Dawley, l'administration orale de NTCMW du 6^{ème} au 19^{ème} jour de gestation à une concentration de 1000 mg/kg/ jour (ce qui fait une dose totale de 14000 mg/kg) n'a pas induit de tératogénicité, malgré un effet sur la fonction immunitaire mis en évidence par une réduction du poids du thymus maternel (Lim et al., 2011).

II.2.4. Ecotoxicité des NTC vis-à-vis des organismes aquatiques

Les activités anthropiques impactent les écosystèmes depuis plusieurs décennies, posant de réels problèmes environnementaux en ce qui concerne la biodiversité et les ressources, notamment dans le milieu aquatique, réceptacle final des polluants. Les contaminants émergents, dont les NTC, deviennent ainsi une source de préoccupation environnementale.

II.2.4.1. Effets des NTC sur les microorganismes autotrophes et hétérotrophes aquatiques

Comme chez les bactéries, les effets toxiques des NTC chez les algues et les protozoaires unicellulaires sont principalement dus à un contact direct avec la surface. La croissance des algues peut être inhibée par l'effet d'ombrage des NTC et la formation d'agglomérats algues-NTC comme suggéré par l'étude menée par Schwab *et al.* (Schwab *et al.*, 2011). Ces travaux ont été menés sur deux algues vertes : *Chlorella vulgaris* et *Pseudokirchneriella subcapitata*, exposées à des NTC bruts ou oxydés, suspendus dans le milieu de culture des algues par sonication. Les résultats obtenus ont montré au bout de 96 h d'exposition à une solution de NTC bien dispersée, une inhibition de croissance de *C. vulgaris* à partir d'une concentration de 0,053 mg/L contre 5,5 mg/L pour *P. subcapitata* qui semble être donc moins sensible aux NTC (Schwab *et al.*, 2011). Dans une autre étude, l'algue marine *Dunaliella tertiolecta* a été exposée à des NTCMW pendant une durée de 96 h. Un retard de croissance a été observé à partir de 5 mg/L. Une induction du stress oxydant et une inhibition de la photosynthèse ont également été notées à 10 mg/L de NTC (Wei *et al.*, 2010)

Pour des essais de toxicité chronique, les protozoaires ciliés *Tetrahymena thermophila* ont été exposés à des NTCSW pendant 96 h. Une première perte de mobilité et une mort cellulaire ont été observées à partir de 1,6 mg/L de NTC. La présence de nanoparticules a également inhibé la capacité bactéricide des protozoaires à partir d'une concentration de 3,6 mg/L. La présence de NTC dans le milieu aquatique peut ainsi perturber un rôle important des protozoaires : la régulation des populations bactérienne (Ghafari *et al.*, 2008).

II.2.4.2. Effets des NTC sur les invertébrés benthiques et pélagiques

De nombreuses études abordant la toxicité aquatique des NTC en eau douce et dans les estuaires mais aussi chez les invertébrés marins vivant à la fois dans la colonne d'eau et dans le benthos sont disponibles.

Une étude récente visant à évaluer les effets chroniques des NTCMW sur une communauté benthique a été réalisée. L'impact de concentrations de NTCMW allant de 0,002 à 2 g/kg sur une durée de 15 mois a été évalué. Les effets observés après 15 mois d'exposition ont été comparés avec ceux obtenus sur une communauté exposée en simultanée à du charbon actif, dans les mêmes conditions expérimentales (Velzeboer et al., 2013). Les résultats obtenus ont montré une variation de 51,7% de la composition de la communauté après 15 mois avec une réduction de NTCMW de 9,9%. L'impact des NTCMW s'est avéré significatif dès les concentrations les plus faibles (0,002 g/kg), Concentration qui peut être considérée comme pertinente pour l'environnement. Les effets observés avec les NTCMW étaient similaires à ceux obtenus avec du charbon actif dont la concentration était 50 fois supérieur à la dose maximal de NTC (2 g/kg), suggérant une sensibilité plus importante des communautés benthiques aux NTCMW (Velzeboer et al., 2013).

L'impact des NTCSW et des NTCMW sur l'immobilisation et la mortalité a également été évalué sur *Daphnia magna*. Les résultats obtenus montrent un immobilisation des daphnies à partir de 48 h d'exposition à une concentration efficace médiane (CE₅₀) de 1,3 mg/L et une induction de la mortalité à une concentration inhibitrice médiane (CI₅₀) de 2,4 mg/L (Zhu et al., 2009). Cette étude a également montré une toxicité aigüe des NTC testés avec un effet dose. Des observations microscopiques ont montré que les daphnies étaient capables d'ingérer les NTC et de les accumuler dans l'intestin. Les auteurs ont également pu noter que les NTCMW avaient la capacité d'adhérer à la surface externe des organismes. L'ensemble des travaux réalisés ont permis de mettre en évidence une toxicité plus importante

avec les NTCMW (Zhu et al., 2009a). Les NTCMW remis en suspension dans de la matière organique naturelle (MON) n'ont cependant induit aucun effet de mortalité à des concentrations de 20 mg/L (Zhu et al., 2009a). En revanche une exposition prolongée sur une durée de 96 h a entraîné une induction de la mortalité à la concentration létale médiane (CL₅₀) de 2,5 mg/L (Kim et al., 2009) et une réduction de croissance à partir de 0,25 mg/L (Edgington et al., 2010).

La reprotoxicité des NTCMW a été testée sur la puce d'eau douce *Ceriodaphnia dubia* en présence de MO sur une durée de 7 jours. Aucune mortalité n'a pu être observée à des concentrations allant jusqu'à 1 mg/L. La croissance a cependant été affectée à partir de 0,2 mg/L. D'autre part, une réduction de la reproduction a été observée à partir d'une LOEC (la plus petite concentration induisant un effet observé) de 0,25 mg/L.

D'autres travaux visant à évaluer l'impact des NTC sur les organismes benthiques ont été réalisés. Le copépode *Amphiascus tenuiremis* a été exposé à des NTCSW dans le but d'évaluer les effets de toxicité aiguë et chronique. Les résultats obtenus ont montré que les NTC dispersés dans de l'eau de mer ont induit une mortalité et une réduction de la mue et de la fertilité à une LOEC de 10 mg/L (Yang et al., 2010). Une étude réalisée sur les organismes vivant dans les sédiments d'eaux douces (l'amphipode *Hyaella Azteca*, le moucheron *chironomus dilutus* et l'oligochète *Lumbriculus variegatus*) a testé la toxicité des NTC mono et multi-parois sur une durée de 14 jours à une concentration de 1 g/L. L'objectif de cette étude a été d'évaluer les effets du prétraitement des NTC (sonication et lavage à l'acide) sur la toxicité. Les NTC lavés à l'acide et débarrassés des métaux présents à leur surface ont montré une toxicité moins importante que les NTC bruts. Les résultats concernant la sonication restent cependant moins claires et dépendent de l'organisme (Mwangi et al., 2012).

II.2.4.3. Effets des NTC sur les vertébrés pélagiques

Les études menées sur les vertébrés aquatiques visent à tester les effets de toxicité aigüe et chroniques induits par les NTC. La plupart de ces travaux sont réalisés soit sur les premières étapes de vie de l'organisme ou alors une fois que son développement est terminé.

Des études ont montré que les nanotubes de carbone peuvent être à l'origine de pathologies au niveau de différents organes (branchies, foies, intestins, cerveaux) mais peuvent aussi induire des défauts de développement, une toxicité respiratoire et un stress oxydant chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) et le poisson zèbre (*Danio rerio*) selon différentes conditions d'exposition (Du et al., 2013). Une autre étude visant à évaluer l'impact des NTC sur le développement a été réalisée sur des embryons de *D. rerio* exposés aux NTCSW sur une durée de 4 à 96 h post-fécondation. Un retard d'éclosion a été observé pour une LOEC de 120 mg/L, alors que le développement embryonnaire n'a pas été affecté à la concentration maximale de 360 mg/L (Cheng et al., 2007). Dans cette même étude des NTCDW ont entraîné un retard d'éclosion à une LOEC de 240 mg/L (Cheng et al., 2007).

La toxicité des NTC et les effets des protocoles de dispersion ont également été testés sur les premiers stades de développement de l'amphibien *Xenopus laevis*. Les larves de xénope ont été exposées à partir du stade 50 [selon la classification de Nieuwkoop and Faber (Nieuwkoop and Faber, 1956)] à différentes concentrations de NTC double et multi-parois, sur une durée de 12 jours. La toxicité aigüe ainsi que la génotoxicité des NTC ont ensuite été évaluées (Mouchet et al., 2011, 2008 ; Bourdiol et al., 2013). Les résultats obtenus avaient montré que dans le cas des NTCDW, la dispersion par la gomme arabique (GA) était plus importante dans le cas des expositions en semi-statique (changement quotidien de milieu) en comparaison avec les expositions en conditions statiques (pas de changement de milieu pendant toute la durée de l'expérience). En conditions semi-statiques, les NTCDW semblent être toutefois moins toxiques avec une mortalité mineure (entre 5 et 15%) observée à 10 mg/L

et un retard de croissance à 100 mg/L. Pour les essais en conditions statiques, un taux de mortalité important (85%) a été observé à 500 mg/L et un retard de croissance à partir de 10 mg/L. Les auteurs suggèrent que la toxicité observée pourrait être due au colmatage des branchies par les NTC avec une réduction du taux d'oxygène (Mouchet et al., 2008). Par ailleurs, des analyses en spectroscopie Raman ont permis de vérifier que les NTC ne traversaient pas la barrière intestinale (Mouchet et al., 2010).

D'autres travaux réalisés sur l'axolotl *Ambystoma mexicanum* ont montré que malgré une forte ingestion de NTC, aucun signe de toxicité, ni de génotoxicité n'a pu être observé même aux concentrations maximales testées (1000 µg/mL) (Mouchet et al., 2007).

Comme nous avons pu le voir à travers ces quelques exemples, les études menées sur l'évaluation des impacts des NTC sur différents organismes montrent dans certains cas des résultats contradictoires en termes de toxicité. Ces différences peuvent être expliquées par la grande variabilité des paramètres d'exposition, telle que la nature des organismes aquatiques, durée de l'exposition, la nature des NTC (SWCNT vs. MWCNT), la teneur variable en sous-produits carbonés et/ou métalliques (Kennedy et al., 2008; Stephen , 2008).

Par ailleurs, en raison de la diversité des caractéristiques des NTC (*e.g.* taille, forme, état de surface, fonctionnalisation, état de dispersion, pureté, composition chimique), pouvant contribuer à la modulation des effets biologiques observés, et de la dimension nanométrique de ces particules, l'étude de l'écotoxicité des NTC n'en est qu'à ses débuts. Les travaux menés jusqu'à ce jour, par le biais de tests *in vitro* et *in vivo*, ont permis de mettre en évidence des effets toxiques chroniques et génotoxiques de ces NTC. Toutefois, les mécanismes régissant la toxicité et l'internalisation potentielle de ces nanoparticules n'ont pas complètement été élucidées.

III. Mécanismes de toxicité des NTC

Comme nous avons pu le voir dans les paragraphes précédents, les travaux récents en écotoxicologie ont permis de mettre en évidence l'impact des nanoparticules sur des organismes aquatiques modèles. L'évaluation de cette écotoxicité est cependant généralement basée sur des marqueurs simples tels que la viabilité et la croissance, qui limitent la compréhension des phénomènes d'interaction entre les nanoparticules et les organismes biologiques. Une meilleure maîtrise de l'impact de ces contaminants nécessite toutefois une meilleure compréhension de leurs mécanismes d'action et d'interaction avec le vivant.

III.1. Adsorption, absorption et translocation des NTC

De plus en plus d'auteurs s'intéressent à la détection des NTC dans différents organes (*e.g.* paroi du tube digestif, foie, cerveau...) ou dans des vecteurs potentiels tels que le sang (Mouchet et al., 2011) dans le but de mettre en évidence des phénomènes potentiels d'adsorption et de translocation des NTC. Ainsi, Il a pu être démontré chez l'homme, que certaines nanoparticules peuvent franchir les différents mécanismes de défense et être transportées sous forme insoluble dans l'organisme (Andujar et al., 2009). Elles peuvent donc se retrouver dans le sang, franchir les membranes pulmonaires ou gastro-intestinales, se distribuer dans les différents organes et s'accumuler à certains sites spécifiques. D'autres peuvent voyager le long des nerfs olfactifs et pénétrer directement dans le cerveau ou encore franchir les barrières cellulaires et rejoindre le noyau de la cellule (Ostiguy et al., 2008). Cependant, qu'il s'agisse de technique microscopique [*e.g.* MET (Edgington et al., 2010) ou spectroscopie Raman (Mouchet et al., 2010, 2011)], aucun NTC n'a pu être détecté dans les tissus biologiques.

Les NTC peuvent également être ingérés par certains organismes aquatiques tels que les larves d'axolotl [*Ambystoma mexicanum* (Mouchet et al., 2007)] et de xénope [*Xenopus*

laevis (Mouchet et al., 2008, 2010, 2011)], les daphnies [*Ceriodaphnia dubia* (Kennedy et al., 2008; Li and Huang, 2011) et *Daphnia magna* [(Roberts et al., 2007, Zhu et al., 2009a, Edgington et al., 2010)], les copépodes [*Amphiascus tenuiremis* (Templeton et al., 2006)] et les poissons [(*Oncorhynchus mykiss* (Smith et al., 2007)]. Des observations microscopiques avaient permis de mettre en évidence la présence de NTC dans leur tube digestif mais aussi dans leurs excréments.

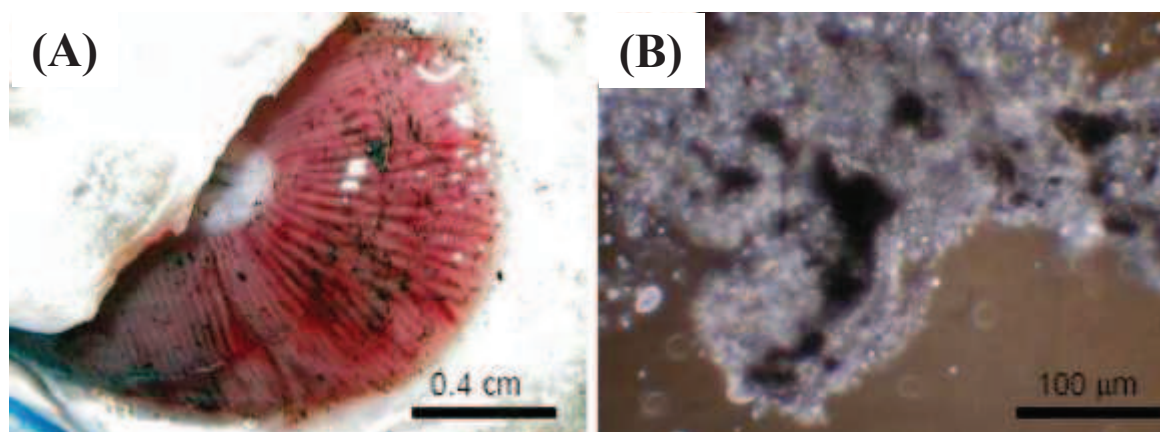


Figure I.6: (A) Sécration de mucus et adsorption de NTCSW à la surface de branchies de truites (*Oncorhynchus mykiss*) exposées à 0,5 mg/L de NTCSW dispersés à l'aide de détergeant (SDS). (B) agglomérats de NTCSW associés aux mucoprotéines (Smith et al., 2007).

Par ailleurs, la présence d'amas noirs a été observée au niveau des corbeilles branchiales de larves de xénope exposées à des suspensions de NTCDW bruts ou dispersées (Mouchet et al., 2008, 2011). Ces masses noires ont également été mise en évidence au niveau des branchies de truite (*Oncorhynchus mykiss*) avec la formation d'agglomérats de NTCSW associés aux mucoprotéines (**figure I 6**) (Smith et al., 2007).

III.2. Induction du stress oxydant

III.2.1. définition

Pour définir le stress oxydant il faut avant tout définir ce que sont les radicaux libres. Un radical libre est une espèce chimique possédant un électron célibataire qui lui confère une réactivité vis-à-vis d'autres molécules. Celle-ci est variable selon la nature du radical. Parmi ceux formés chez les êtres vivants, l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$) et le NO sont peu réactifs mais peuvent déclencher des réactions en chaîne qui forment des radicaux libres beaucoup plus réactifs.

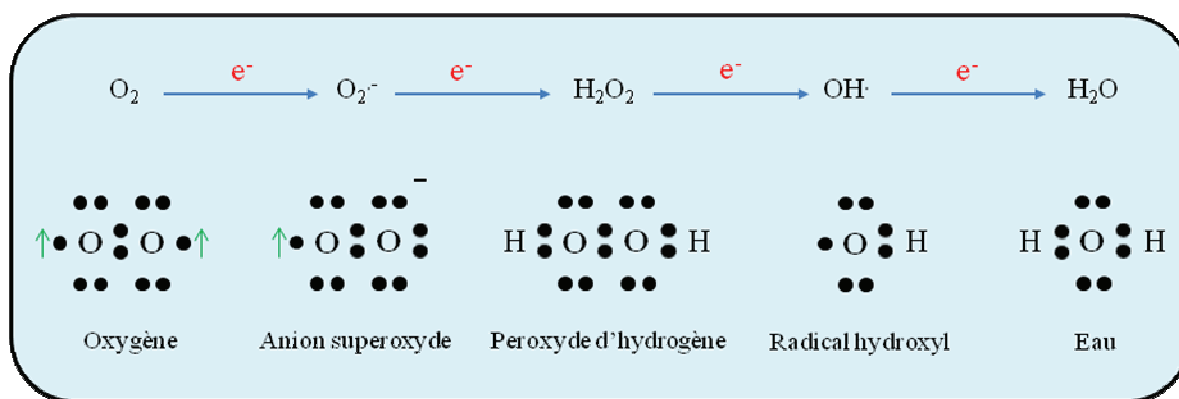


Figure I.7: Transformations chimiques (réductions successives) de l'oxygène moléculaire dans un système biologique (Shahid, 2010)

Les radicaux peroxydes (ROO^{\bullet}) et hydroxyle (OH^{\bullet}) sont très réactifs et sont issus respectivement de l'oxydation des lipides (peroxydation) et du clivage du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par la réaction de Fenton ($H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^{\bullet}$). Il existe aussi d'autres espèces dérivées de l'oxygène comme l' H_2O_2 , l'oxygène singulet (1O_2) et l'acide peroxynitreux ($ONOOH$), qui, s'ils ne sont pas des radicaux libres au sens propre, sont très réactifs et peuvent eux aussi conduire à l'oxydation des molécules. Les radicaux libres sont formés le plus souvent par gain d'électron à partir de l' O_2 (**figure I.7**). L' H_2O_2 produit de la dismutation de l' $O_2^{\bullet -}$, est beaucoup plus stable que ce dernier et a la capacité de diffuser à travers les membranes biologiques.

L'O₂ est indispensable au fonctionnement cellulaire mais constitue également une source d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) qui peuvent oxyder des macromolécules telles que l'ADN, les protéines et les lipides. C'est le paradoxe de l'oxygène. Notons toutefois que les ERO sont des produits essentiels au fonctionnement cellulaire. Ils sont en effet impliqués dans la prolifération des cellules, la mort cellulaire programmée et agissent comme second messenger (Thannickal and Fanburg, 2000, Dröge, 2002). Au sein des cellules, un équilibre (une quantité d'ERO nécessaire et suffisante au bon fonctionnement cellulaire) est maintenu grâce à un système d'élimination des ERO. Un stress oxydant peut ainsi être défini comme un déséquilibre en faveur de la production d'ERO qui conduit à une oxydation accrue des composants cellulaires essentiels. Ce déséquilibre pro/antioxydants peut avoir une origine endogène (*e.g.* dysfonctionnement de certaines sources de production ou d'élimination de ROS) ou exogène telles que des toxines ou des contaminants.

III.2.2. Stress oxydant et nanotubes de carbone

La toxicité intrinsèque des nanoparticules (y compris les nanotubes de carbone) a souvent été attribuée à leurs caractéristiques physico-chimiques uniques (*i.e.* leur petite taille, leur grande surface par unité de masse et leur forte réactivité) (Auffan et al., 2009). Cette réactivité physico-chimique est fréquemment corrélée à la capacité de ces nanoparticules à déclencher la formation de radicaux libres de manière directe ou *via* l'activation de la voie enzymatique oxydative conduisant à un stress oxydant.

Dans le cas des NTC, trois scénarios pourraient être impliqués dans l'induction du stress oxydant et la génération d'un excès de radicaux libres. En premier lieu, cette induction pourrait être due à une activité redox inhérente aux NTC ou à leur capacité à catalyser une activité redox du fait de leurs caractéristiques / propriétés de surface. De plus en considérant les NTC comme bio-persistants, ils pourraient induire une réponse inflammatoire initiant la

mobilisation et l'activation de leucocytes inflammatoires, générant ainsi un excès de radicaux libres. Enfin les NTC pourraient pénétrer dans les cellules et interagir physiquement avec elles, entraînant des dommages structurels au niveau d'organelles telles que la mitochondrie, entraînant là aussi la production en excès de radicaux libres (Petersen and Nelson, 2010). Par ailleurs l'induction du stress oxydant par les NTC pourrait être reliée à la présence de catalyseurs métalliques présents à leur surface. En effet différents travaux ont montré l'implication des particules métalliques de synthèse dans l'induction du stress oxydant (Shvedova et al., 2012).

III.2.3. Systèmes antioxydants

Le maintien d'un niveau non cytotoxique d'ERO chez les organismes vivants est assuré par des systèmes antioxydants. Un antioxydant peut être défini comme toute substance capable à une concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables en retardant ou en empêchant leur oxydation.

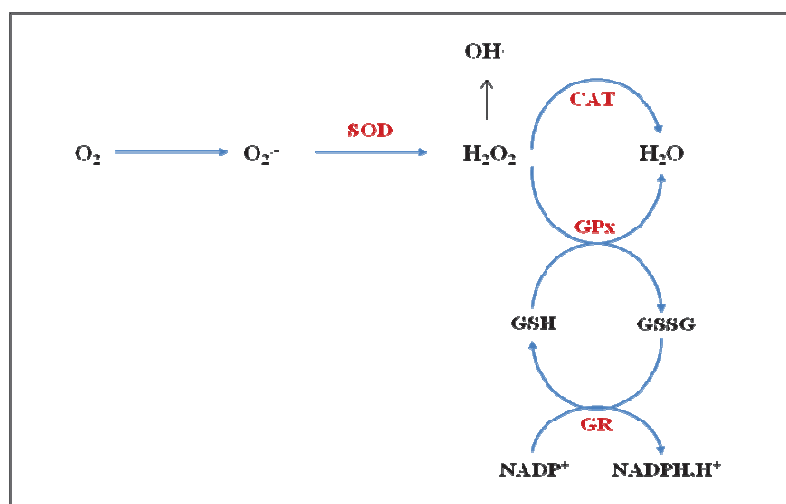
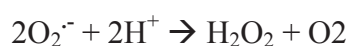


Figure I.8: Schéma des défenses anti-oxydantes enzymatiques (<http://www.olivie.ma/fr>)

Les antioxydants cellulaires peuvent être enzymatiques ou non-enzymatiques (vitamine E et C). Dans le cadre de ce travail, nous nous focaliserons essentiellement sur les antioxydants enzymatiques et plus particulièrement la superoxyde dismutase, la glutathion réductase, la glutathion peroxydase et la catalase (**figure I.8**).

III.2.3.1. La superoxyde dismutase (EC 1.15.1.1)

La superoxyde dismutase (SOD) est une métallo enzyme produite dans toutes les cellules aérobies. Elle représente la première ligne de défense contre le stress oxydatif produit par les ERO. Cette enzyme catalyse la dismutation de l'O₂⁻ en H₂O₂ (McCord and Fridovich, 1969) qui pourra être pris en charge par des enzymes à activité peroxydase.



La SOD est présente chez tous les organismes aérobies et représente l'une des enzymes les plus abondamment synthétisées dans les cellules.

Chez l'homme et les mammifères, il y a coexistence de trois isoformes de SOD : une forme cytosolique et nucléaire associée aux ions cuivre et zinc (SOD-1), une forme mitochondriale associée au manganèse (SOD-2) et une forme extracellulaire (SOD-3).

Chez les eucaryotes il n'existe que deux types de SOD. La Cu/Zn-SOD, un homodimère de poids moléculaire de 32500 daltons, présente dans le compartiment cytosolique cellulaire et la Mn SOD, présente au niveau des mitochondries.

Chez les amphibiens, il a été démontré que cette enzyme est fortement présente dans le cerveau contrairement au foie où on la trouve en très faible quantité (Pérez-Campo et al., 1993). A l'inverse, chez la truite *Salmo Trutta* cette enzyme est majoritairement présente au niveau du foie (Pérez-Campo et al., 1993).

L'induction de l'activité SOD en réponse à une exposition à des NTC a été mise en évidence par plusieurs études. Par exemple, Il a été rapporté par Saxena *et al.*, (Saxena et al.,

2009) une forte activation de la SOD chez différentes souches de *Staphylococcus aureus* en réponse à une exposition à des NTCMW.

D'autres travaux réalisés sur le ver du fumier *Eisenia fetida*, ont mis en évidence une augmentation de l'activité SOD après une exposition à 200 mg/L de NTCMW pendant 2 jours. Cette augmentation ne devient toutefois significative qu'à partir de 400 mg/L (Zhang et al., 2014).

L'analyse transcriptomique de cellules épithéliales bronchiques humaines exposées à une concentration de 6,6 µg/mL de NTCSW pendant 24 h a montré une nette augmentation de l'expression de la SOD-1 (SOD cytosolique) mais pas la SOD-2 (SOD mitochondriale) qui reste à des taux similaires à ceux du contrôle négatif (Park et al., 2014).

A l'opposé, d'autres travaux utilisant des cellules épithéliales pulmonaires de rat comme modèle d'étude ont mis en évidence une diminution de 30 et 40% du taux des enzymes SOD-1 et SOD-2 respectivement au bout de 24 h d'exposition à 2,5 µg/mL de NTCSW et ceci en comparaison avec le contrôle (Sharma et al., 2007).

L'inhibition de l'activité SOD a également été observée sur des cellules d'*Arabidopsis thaliana* exposées à des concentrations allant de 10 à 600 mg/L de NTCMW (Lin et al., 2009a). Les essais réalisés sur des agglomérats de NTC de tailles différentes ont mis en évidence une corrélation entre la diminution de l'activité SOD et la dimension des agglomérats de nanoparticules. En effet, après une exposition de 30 min à une concentration de 10 mg/L de NTCMW, une diminution significative de l'activité SOD a été observée pour les plus petits agglomérats (Lin et al., 2009a).

L'ensemble de ces travaux montre l'influence des nanotubes de carbone sur l'activité SOD chez les organismes vivants. L'effet des NTC semble toutefois dépendre de plusieurs paramètres (organisme étudié, concentration, état de dispersion, durée d'exposition,...).

III.2.3.2. La glutathion peroxydase (EC 1.11.1.9)

La glutathion peroxydase (GPx) est une enzyme à sélénium , découverte en 1957 par Gordon Mills (Mills, 1959). Cette enzyme est présente dans les liquides extra cellulaires mais aussi au niveau du cytosol et des mitochondries où elle assure la transformation des hydroperoxydes organiques et lipidiques notamment de type ROOH en ROH (Taniguchi, 2012).

La GPx est l'enzyme clef du système antioxydant et nécessite la présence de glutathion réduit (GSH) comme donneur d'électron. Le glutathion disulfite (GSSG) ainsi produit est à nouveau réduit par la glutathion réductase, qui utilise le NADPH comme donneur d'électrons (**figure I 8**). Le rapport GSH/GSSG est un indice de l'état d'oxydation dans la cellule.

Différents travaux visant à étudier l'effet oxydant des NTC ont pu montrer l'impact de ces derniers sur l'activité GPx. Il a ainsi été démontré qu'une exposition de l'escargot d'eau douce *Lymnaea luteola* à des concentrations relativement faibles de NTCSW (0,3 mg/L) pendant 96 h était à l'origine d'une forte diminution de l'activité GPx (Ali et al., 2014).

Chez le poisson d'eau douce *Carassius auratus*, une exposition à des NTCMW avait également entraîné une diminution significative de l'activité GPx au bout de 3 jours. Cette inhibition n'a toutefois pu être observée à la fin de l'expérience (12 jours) (Qu et al., 2014).

D'autres travaux réalisés sur deux espèces marines (le ver *Hediste diversicolor* et la moule *Mytilus galloprovincialis*) exposées à une concentration de 1, 5 et 10 mg/L de NTCSW pendant 24 et 48 h, ont montré que la présence des NTC dans le milieu pouvait affecter le système antioxydant dans certaines conditions expérimentales. Chez le ver *H. diversicolor* des similaires de l'activité GPx ont été observées aux différentes concentrations testées. Une légère inhibition a toutefois été observée au bout de 48 h d'exposition à 10 mg/L. Chez la moule *M. galloprovincialis* l'activité GPx, a quant à elle, considérablement diminuée aux

deux concentrations les plus élevées (5 et 10 mg/L) aussi bien après 24 h que 48 h d'exposition (Moschino et al., 2014).

Au final, il semblerait que l'activité GPx soit négativement impactée par la présence de NTC, probablement due à une diminution du glutathion intracellulaire elle-même induite par un phénomène de cytolysse et/ou d'apoptose, provoquée par une forte production d'ERO (Sharma et al., 2007).

III.2.3.3. La catalase (EC 1.11.1.6)

La catalase (CAT) réagit efficacement avec l'H₂O₂ pour donner de l'eau et de l'O₂.



Elle est localisée principalement dans le peroxyosome mais on peut la retrouver également dans le cytoplasme. La GPx et la CAT permettent ensemble l'élimination du H₂O₂. Toutefois, la catalase semble jouer un rôle important en présence de fortes concentrations en H₂O₂, alors que la GPx prend en charge les hydroperoxydes et l'H₂O₂ même en faible quantité.

Comme pour les autres enzymes, l'implication de l'activité CAT dans la réponse à une exposition aux NTC a été mise en évidence par plusieurs travaux.

L'inhalation des NTC mono ou multi-parois par des souris pendant une durée de 7 jours a entraîné une diminution de 40 à 50% de l'activité CAT au niveau des poumons (Ravichandran et al., 2011).

Cette inhibition de l'activité CAT a également été observée chez le poisson *Carassius auratus* chez lequel une exposition de 12 jours à des NTCMW avait entraîné une diminution d'environ 19,1% de l'activité CAT en comparaison avec le témoin négatif (Qu et al., 2014).

Au contraire, l'exposition de lignées cellulaires, provenant d'adénocarcinomes coliques, à différentes concentrations de NTCSW (de 0 à 1000 µg/mL) pendant 24 h a

entraîné une production significativement importante d'ERO à partir de 100 µg/ml et qui a atteint son maximum à 1000 µg/mL. Cette forte production d'ERO a été accompagnée d'une induction maximale de l'activité CAT à 500 µg/ml de NTC qui a ensuite diminué à la plus forte concentration testée (1000 µg/ml) (Pichardo et al., 2012).

Chez la plante *Vicia faba*, une corrélation a été observée entre l'activation de catalase au niveau des feuilles et l'augmentation de la concentration de NTCMW dans le milieu de culture. Les auteurs justifient cette augmentation par une probable élimination d'H₂O₂ (Wang et al., 2014).

En résumé, il semble que l'activation ou l'inhibition de l'activité CAT en présence de NTC serait largement tributaire des conditions expérimentales rapportées dans ces études.

III.2.3.4. La glutathion réductase (EC 1.6.4.2)

La glutathion réductase (GR), également connue sous le nom de glutathion disulfure réductase est une enzyme homodimère capable de catalyser la réduction du glutathion disulfure (GSSG) en glutathion sulfhydryle (GSH) aux dépens du NADPH qui lui-même est régénéré grâce à la glucose-6-phosphate déshydrogénase.



Cette enzyme est présente dans de nombreux tissus où elle permet le maintien d'un niveau adéquat de GSH cellulaire et protège ainsi les cellules contre l'oxydation.

A ce jour, plusieurs travaux ont montré l'implication de l'activité GR dans la réponse à une exposition à des nanotubes de carbone.

Une exposition *in vitro* de cellules humaines coliques à différentes concentrations de NTCSW (0 à 1000 µg/mL) pendant une durée de 24 h a entraîné une faible inhibition de l'activité GR, observée à partir de 1000 µg/mL (Pichardo et al., 2012).

L'étude de l'impact de l'inhalation de NTC mono ou multi-parois sous forme d'aérosols par des souris, pendant une durée d'une semaine à raison de 20 min d'inhalation par jour, a permis de mettre en évidence l'impact des NTC sur différents paramètres du stress oxydant. La détection de différentes activités enzymatiques par immunoblot a permis d'observer une inhibition de l'activité GR pulmonaire après une exposition aux NTC. Parmi les paramètres mesurés, l'activité GR pulmonaire semble être inhibée après une exposition aux NTC (Ravichandran et al., 2011).

Chez le poisson d'eau douce *Cyprinus carpio*, une exposition *in vitro* du cerveau et des branchies aux fullerènes (C₆₀) a entraîné de nombreux dommages oxydatifs malgré un temps de contact relativement court. En effet, les organes ont été exposés pendant seulement 1, 2 ou 4 h à la concentration de 1 mg/L de C₆₀. La mesure de l'activité GR a indiqué une forte induction dans le cerveau après 4 h et dans les branchies après seulement 1 h (Ferreira et al., 2012).

Plus récemment, Hu *et al.*, (Hu et al., 2013) se sont intéressés à l'impact des NTCMW sur le ver *Eisenia fetida*. Pour ce faire, des vers ont été exposés à différentes concentrations de nanotubes (0,1 ; 1 et 10 mg/kg de sol) seuls ou adsorbés sur du nonylphénol. Après une exposition de 7 jours les auteurs n'ont observé aucun effet significatif des NTC sur l'activité GR et ce pour toutes les conditions expérimentales testées.

L'activité GR reste donc, comme pour les autres enzymes, dépendante des paramètres expérimentaux et des conditions d'exposition.

III.2.3.5. Les peroxyrédoxines

Les peroxyrédoxines (Prx) ou thiorédoxines peroxydases, ont été découvertes il y a une vingtaine d'années et font l'objet de nombreux travaux concernant leurs fonctions anti-oxydantes (Kim et al., 1988; Rhee et al., 2005; Wood et al., 2003). Elles sont localisées dans le cytosol, les mitochondries, les peroxysomes, associées au noyau et aux membranes et

permettent la dégradation du H_2O_2 , des hydroperoxydes organiques ainsi que des peroxydinitrites (Fisher et al., 1999). Ces enzymes peuvent être divisées en 6 types. Les Prx 1-5 disposent de 2 résidus de cystéine actifs et utilisent les thiorédoxines ou le glutathion comme substrat réducteur. Les Prx 6, quant à elles, possèdent un seul résidu de cystéine actif et utilisent le glutathion pour la réduction catalytique de l' H_2O_2 et divers hydroperoxydes organiques (Wood et al., 2003, Manevich et al., 2004, Knoops et al., 2007)

En plus de leur capacité à dégrader l' H_2O_2 , les peroxyrédoxines agissent également comme molécules de signalisation (Hall et al., 2009). En effet, certaines Prx telles que le PRDX-1 répondent aux stress oxydant par la formation d'un complexe oligomérique. Ce dernier va agir comme un super chaperon et protéger ainsi les autres protéines de la dégradation (Jang et al., 2004).

Chez l'amphibien *Xenopus laevis*, il existe 2 isoformes de la protéine PRDX codé par 2 gènes différents, *xen1* et *xen2*. Ce dernier est exprimé durant tous les stades de développement, avec une expression plus importante entre les stades 0 et 5 selon la classification de Nieuwkoop and Faber (Nieuwkoop and Faber, 1956). *xen1* est, quant à lui, exprimé beaucoup plus tardivement (à partir du stade 47-48) (Sharapov et al., 2011).

L'implication des Prx dans la réponse à un stress oxydant induit par les NTC a été mise en évidence dans quelques travaux. La mesure de ce marqueur reste toutefois peu utilisée.

Une exposition de cellules d'hépatome humain à une concentration de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ de NTCSW ou de graphène pendant 48 h, semble impacter le système anti-oxydatif et notamment les protéines PRDX. En effet, ces dernières sont positivement régulées par la présence de NTCSW et de graphène dans le milieu de culture. L'induction reste toutefois moins importante dans le cas du graphène (Yuan et al., 2011). Au contraire, une exposition de

kératinocytes humains à une concentration de 0,4 mg/mL de NTCMW pendant 24 à 48 h a entraîné une inhibition des protéines PRDX (Witzmann and Monteiro-Riviere, 2006).

De nombreux travaux n'ont toutefois pas pu mettre en évidence l'impact des NTC sur les peroxyrédoxines. Ainsi Blaze-Yost *et al*, n'ont observé aucune induction des protéines PRDX après une exposition de 48 h à 0,004 ou 0,04 µg/mL de fullerènes (C60) ou de NTC mono ou multi-parois (Blaze-Yost et al., 2011).

D'autres expériences ont été réalisées sur des souris instillées par voie intra-trachéale avec des NTCSW à une concentration de 0,5 mg/kg. Après un traitement de 3 et 14 jours, l'expression de plusieurs enzymes tels que PRDX-5, impliqué dans la détoxification de l'H₂O₂, reste inchangée quel que soit la durée de l'exposition (Chou et al., 2008).

Chez le poisson tête de boule, *Pimephales promelas*, l'injection par voie intra péritonéale de fullerènes (C60) n'a entraîné au bout de 48 h aucune différence significative de l'expression du gène *prdx2* en comparaison avec le témoin et ceci pour toutes les concentrations testées (0,2 ; 2 et 20 µg de NTC /g de poids frais) (Jovanović et al., 2011).

III.2.4. Dégâts oxydatifs cellulaires

III.2.4.1. Dommages oxydatifs de l'ADN

Il existe au sein de la cellule deux types d'ADN : l'ADN nucléaire (ADNn) et l'ADN mitochondrial (ADNmt). Ce dernier est la cible privilégiée des oxydations par les ERO du fait de son potentiel de réparation plus faible que celui de l'ADN nucléaire et de sa proximité directe de l'une des sources d'ERO cellulaire : la chaîne respiratoire mitochondriale. Ainsi le taux de bases oxydées serait 2 à 3 fois supérieur dans l'ADNmt par rapport à l'ADNn

Les réactions d'oxydation de l'ADN créent un grand nombre de dommages qui peuvent être dus à une oxydation directe (*e.g.* lésions de bases puriques et pyrimidiques) ou la formation d'adduits à l'ADN. Bien que cette oxydation soit naturellement induite au cours de

différents processus de développement des organismes, celle-ci peut être largement influencée par la présence de certains xénobiotiques et présenter de graves conséquences pour l'organisme.

L'induction de dommages à l'ADN en présence de NTC a été mise en évidence depuis quelques années chez différents organismes vivants.

Ainsi Zhu *et al.*, ont pu noter une induction de dommages à l'ADN dans des cellules souches embryonnaires de souris exposées à des NTCMW (Zhu et al., 2007a). En effet le dosage de la protéine P53, connu pour son implication dans la réponse à un stress génotoxique, a permis d'observer un accroissement des dommages à l'ADN avec l'augmentation de la concentration en NTC mais aussi avec l'allongement de la durée d'exposition. Les premiers effets ont été observés à partir de 2 h pour une concentration en NTCMW de 5µg/ml (Zhu et al., 2007a).

La capacité des NTC à induire des dommages à l'ADN a également été démontrée *in vivo* chez des rats gavés avec des NTCSW à des concentrations allant de 0,064 à 0,64 mg/kg pendant 24 h. Une augmentation significative des dommages oxydatifs de l'ADN au niveau des tissus pulmonaires et hépatiques a été observée par le dosage de la 8-oxo-deoxyguanosine, un marqueur des lésions oxydatives de l'ADN (Folkmann et al., 2009).

Chez certains organismes aquatiques tels que le ver *Lymnaea luteola*, l'impact des NTCSW sur l'altération de l'ADN a été évalué grâce au test des Comètes que nous aborderons plus en détail dans le **chapitre III**. Après une exposition à différentes concentrations de NTCSW, les auteurs ont observé une augmentation significative des lésions à l'ADN à partir de 24 h pour les concentrations les plus faibles (0,05 mg/L). Le maximum de dommages a toutefois été observé après 96 h d'expositions à 0,3 mg/L (Ali et al., 2014). Au contraire, la présence de NTCSW dans le sédiment à des concentrations allant de 0,003 à 0,03

g/kg n'a montré aucun effet sur le pourcentage d'ADN dans la queue chez le ver de vase *Arenicola marina* (Galloway et al., 2010).

III.2.4.2. peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique est une conséquence du stress oxydant mais aussi un relais pour sa propagation. Le mécanisme requiert un acide gras polyinsaturé avec au moins un motif 1,4-cis-pentadiène tel que l'acide arachidonique. Les hydroperoxydes formés à partir de la peroxydation de l'acide arachidonique sont toxiques pour les cellules. Ils sont normalement réduits par une glutathion peroxydase en acides gras mono-hydroxylés. Cependant, l'activité de cette enzyme est diminuée dans certaines conditions de stress et entraîne par conséquent un accroissement de la durée de vie de ces hydroperoxydes.

Il existe de nombreux marqueurs de la peroxydation lipidique. Les plus connus restent le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonénal (4-HNE) (Eriyamremu *et al.*, 2008; Queisser and Schupp, 2012 ; Bacchetta *et al.*, 2014) (**figure I.9**). Ces deux derniers produits peuvent interagir aussi bien avec l'ADN qu'avec les protéines. Une fois fixé à la molécule d'ADN, le MDA semble être le produit le plus mutagène, alors que le 4-HNE est plus toxique pour la cellule.

Une étude réalisée sur l'impact cytotoxique des NTCMW sur des cellules HeLa a permis de mettre en évidence une induction de la peroxydation des lipides en présence de nanoparticules de carbone. En effet en absence de NTC, le MDA reste à un niveau très basal. Au contraire, lorsque les cellules sont incubées pendant 2 h dans une solution contenant 100 µg/ml de NTCMW, une forte augmentation du MDA est observée (Zhu et al., 2009b).

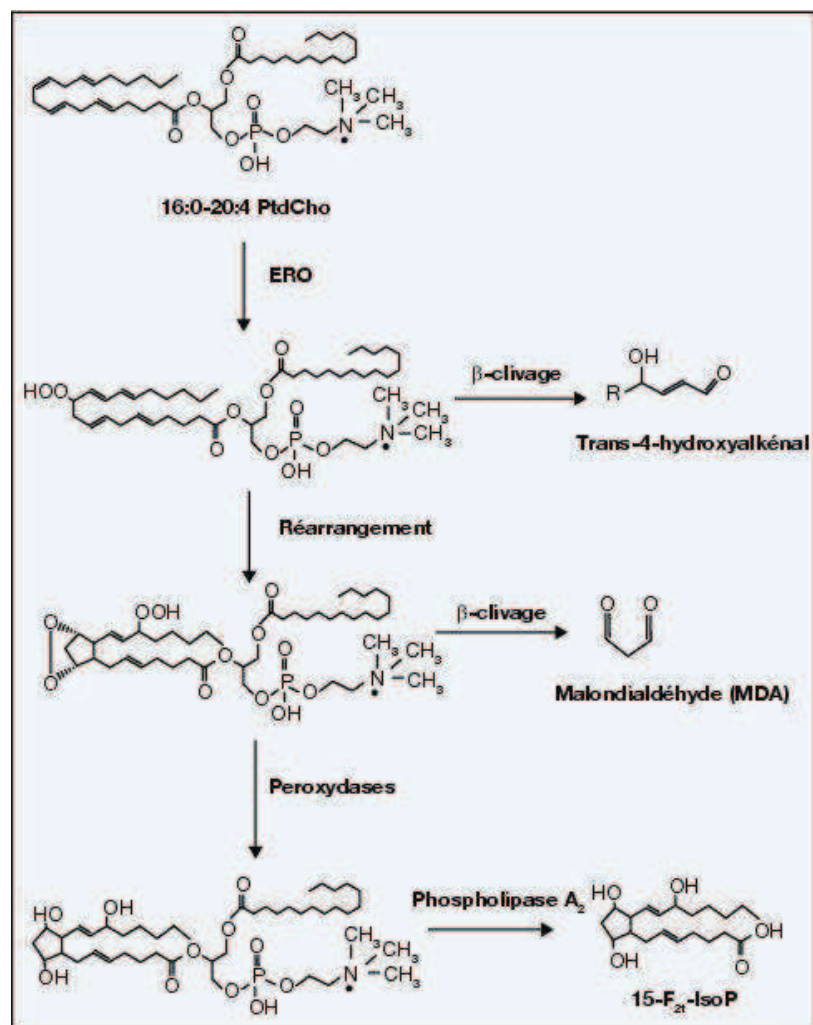


Figure I.9: Schéma de formation des produits « primaires » et « secondaires » de la peroxydation lipidique à partir de l'acide arachidonique (Guichardant et al., 2006).

Chez les souris C57BL/6, une exposition à des NTCSW a entraîné une augmentation du niveau de peroxydation lipidique mesuré par le dosage du MDA. En effet la concentration de ce dernier était 21%, 31% et 44% plus importante que le témoin après 1, 7 et 28 jours d'exposition, respectivement (Shvedova et al., 2008). La peroxydation des lipides a également été mise en évidence par ces mêmes auteurs grâce au dosage du 4-HNE. Ce dernier a été induit chez les souris C57BL/6 après seulement 1 jour d'exposition à des NTCSW (10 µg/kg) avec une réponse dose et temps dépendante (Shvedova et al., 2005).

Lorsque des vers de fumier *E. fetida* sont exposés pendant 2 jours à différentes concentrations de NTCW, une augmentation de la concentration su MDA a été observée à partir de 200 mg/L de NTC. Cette concentration augmente ensuite pour atteindre son maximum à 400 mg/L de NTC puis diminue à la plus grande concentration testée (1000 mg/L) (Zhang et al., 2014).

D'autres travaux ont également été réalisés sur des organismes aquatiques tels que *Carassius auratus* chez qui l'exposition à des NTCSW combinés à du cadmium était à l'origine d'une augmentation remarquable du niveau de MDA. Cette augmentation n'a toutefois pas été observée en présence du cadmium seul (Qu et al., 2014.).

Chez les embryons de poisson zèbre, la présence de fullerènes (C60 et C70) à différentes concentrations dans le milieu n'a montré aucune induction du 4-HNE en comparaison avec les contrôles négatifs (Usenko, 2007).

III.2.4.3. Induction de la réponse inflammatoire

La peroxydation lipidique est très souvent associée à une réponse pro-inflammatoire. En effet, il est connu depuis longtemps que les eicosanoïdes tels que les prostaglandines et les leucotriènes sont des médiateurs de la réponse inflammatoire. Or ces eicosanoïdes sont engendrés par les acides gras polyinsaturés à 20 carbones, notamment l'acide arachidonique, libéré des phospholipides membranaires, principalement grâce à l'action de la phospholipase A2 (**figure 1.10**)

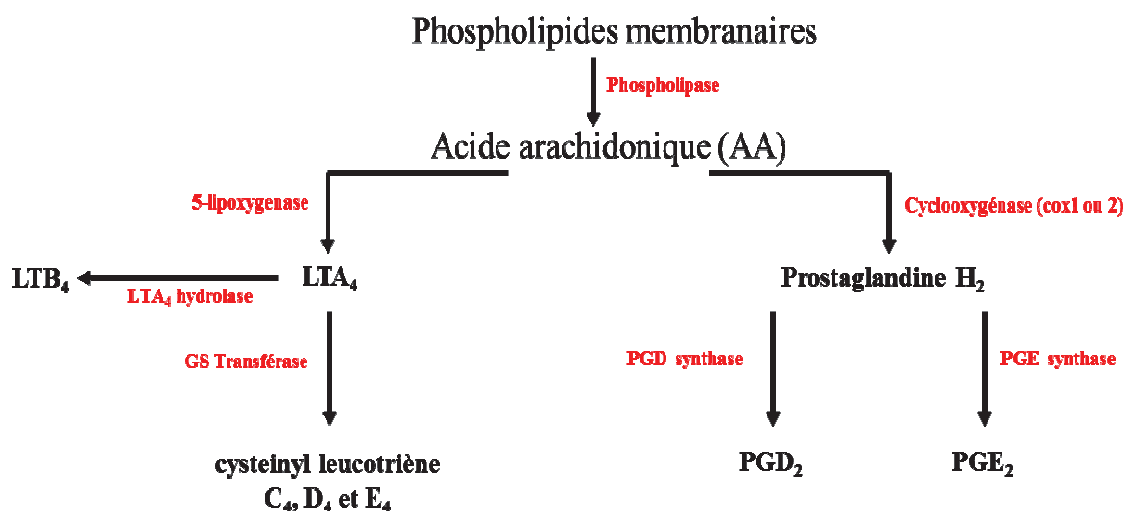


Figure I.10 : formation de marqueurs pro-inflammatoires à partir de l'acide arachidonique (<http://www.iamast.com/>)

Les cyclo-oxygénases (COX), ou encore appelées prostaglandines H synthases, sont des enzymes clés de la biosynthèse des prostaglandines (**figure I.10**). Il existe deux isoformes de la cyclo-oxygénase, COX-1 et COX-2, tous deux capables de métaboliser l'acide arachidonique en prostaglandines (Smith and Langenbach, 2001). COX-1 est constitutivement exprimé dans les tissus alors que COX-2 est plutôt inducible.

L'implication des cyclo-oxygénases (essentiellement COX-2) dans la réponse à une exposition aux NTC a été démontrée dans de nombreux travaux.

Des lignées cellulaires de macrophages mises au contact de 50µg/mL de NTCMW pendant 24 h ont montré une forte expression de COX-2. Les auteurs ont observé que l'induction de COX-2 était corrélée avec une augmentation des prostaglandine E2 (PGE₂) (Lee et al., 2012).

D'autres travaux menés sur des souris ont montré l'importance de COX-2 dans la protection contre l'inflammation induite par des NTCMW. En effet, des souris mutées au niveau du gène *cox-2* (COX-2^{-/-}), ayant reçu une dose de 4 mg/kg délivrée aux poumons par

aspiration oropharyngée ont montré, en comparaison avec souches sauvages, une forte inflammation pulmonaire. Les auteurs ont également observé une augmentation de PGD₂. La concentration des ARNm de COX-1 était, quant à elle, inchangée aussi bien chez les animaux sauvages que chez les souris COX-2^{-/-} (Sayers et al., 2013).

Les acides gras peroxydés peuvent également être pris en charge par des lipoxygénases et entraîner la formation de leucotriènes. L'implication de ces derniers dans la réponse pro-inflammatoire induite par la présence de NTC, a également été mise en évidence.

L'exposition de hamsters dorés Syriens à différentes concentrations de NTCSW pendant 1 ou 3 jours a montré une augmentation significative des leucotriènes B₄ (LTB₄) au niveau des cellules broncho-alvéolaires. La mesure des lipoxygénases (LOX) par immunohistochimie a montré une forte intensité de la 5-LOX au niveau des parois et des macrophages alvéolaires pour tous les temps et toutes les concentrations testés (Sukhija, 2011).

Références bibliographiques

- Ali, D., Ahmed, M., Alarifi, S., Ali, H., **2014**. Ecotoxicity of single-wall carbon nanotubes to freshwater snail *Lymnaea luteola* L.: Impacts on oxidative stress and genotoxicity. *Environ. Toxicol.* 1522-7278.
- Andujar, P., Lanone, S., Brochard, P., Boczkowski, J., **2009**. Effets respiratoires des nanoparticules manufacturées. *Rev Mal Respir.* 26 (6), 625–637.
- Aschberger, K., Johnston, H.J., Stone, V., Aitken, R.J., Hankin, S.M., Peters, S.A.K., Tran, C.L., Christensen, F.M., **2010**. Review of carbon nanotubes toxicity and exposure—appraisal of human health risk assessment based on open literature. *Crit. Rev. Toxicol.* 40, 759–790.
- Auffan, M., Rose, Jérôme, Bottero, J.-Y., Lowry, Gregory V., Jolivet, J.-P., Wiesner, M.R., **2009**. Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. *Nat Nano.* 4, 634–641.
- Bacchetta, R., Moschini, E., Santo, N., Fascio, U., Del Giacco, L., Freddi, S., Camatini, M., Mantecca, P., **2014**. Evidence and uptake routes for Zinc oxide nanoparticles through the gastrointestinal barrier in *Xenopus laevis*. *Nanotoxicology.* 8, 728-744.
- Barillet, S., Simon-Deckers, A., Herlin-Boime, N., Mayne-L’Hermite, M., Reynaud, C., Cassio, D., Gouget, B., Carrière, M., **2010**. Toxicological consequences of TiO₂, SiC nanoparticles and multi-walled carbon nanotubes exposure in several mammalian cell types: an *in vitro* study. *J Nanopart Res.* 12, 61–73.
- Barone, P.W., Baik, S., Heller, D.A., Strano, M.S., **2005**. Near-infrared optical sensors based on single-walled carbon nanotubes. *Nat Mater.* 4, 86–92.
- Bédier, A., Seichepine, F., Flahaut, E., Loubinoux, I., Vaysse, L., Vieu, C., **2012**. Elucidation of the Role of Carbon Nanotube Patterns on the Development of Cultured Neuronal Cells. *Langmuir.* 28, 17363–17371.
- Bethune, D.S., Klang, C.H., De Vries, M.S., Gorman, G., Savoy, R., Vazquez, J., Beyers, R., **1993**. Cobalt-catalysed growth of carbon nanotubes with single-atomic-layer walls. *Nature* 363, 605–607.
- Blaze-Yost, B.L., Banga, A., Amos, A., Chernoff, E., Lai, X., Li, C., Mitra, S., Witzmann, F.A., **2011**. Effect of carbon nanoparticles on renal epithelial cell structure, barrier function, and protein expression. *Nanotoxicology.* 5, 354–371.
- Bordere, S., J.M. Corpart, NE. El Bounia, P. Gaillard, d, N. Passade-Boupat, P.M. Piccione, D. Plée, **2011**. Industrial production and applications of carbon nanotubes.

Bourdiol, F., Mouchet, F., Perrault, A., Fourquaux, I., Datas, L., Gancet, C., Boutonnet, J.-C., Pinelli, E., Gauthier, L., Flahaut, E., **2013**. Biocompatible polymer-assisted dispersion of multi walled carbon nanotubes in water, application to the investigation of their ecotoxicity using *Xenopus laevis* amphibian larvae. *Carbon*. 54, 175–191.

Cañas, J.E., Long, M., Nations, S., Vadan, R., Dai, Lenore, Luo, M., Ambikapathi, R., Lee, E.H., Olszyk, D., **2008**. Effects of functionalized and nonfunctionalized single-walled carbon nanotubes on root elongation of select crop species. *Environ Toxicol Chemi.* 27, 1922–1931.
Cao, A., Dickrell, P.L., Sawyer, W.G., Ghasemi-Nejhad, M.N., Ajayan, Pulickel M., **2005**. Super-Compressible Foamlike Carbon Nanotube Films. *Science*. 310, 1307–1310.

Cele, L.M., Coville, N.J., **2009**. The negative effects of alcohols on carbon nanotube synthesis in a nebulised spray pyrolysis process. *Carbon*. 47, 1824–1832.

Cheng, J., Flahaut, E., Cheng, S.H., **2007**. Effect of carbon nanotubes on developing zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Environ Toxicol Chem.* 26, 708–716.

Chou, C.-C., Hsiao, H.-Y., Hong, Q.-S., Chen, C.-H., Peng, Y.-W., Chen, H.-W., Yang, P.-C., **2008**. Single-Walled Carbon Nanotubes Can Induce Pulmonary Injury in Mouse Model. *Nano Lett.* 8, 437–445.

D&Consultants, **2012**. Les réalités industrielles dans le domaine des nanomatériaux en France Analyse de la réalité du poids des nanomatériaux dans la filière industrielle concernée.

Dai, H., Rinzler, A.G., Nikolaev, Pasha, Thess, Andreas, Colbert, Daniel T., Smalley, Richard E., **1996**. Single-wall nanotubes produced by metal-catalyzed disproportionation of carbon monoxide. *Chemical Physics Letters*. 260, 471–475.

Díaz, G., Benaissa, M., Santiesteban, José G., José-Yacamán, M., **1998**. Carbon Nanotubes Prepared by Catalytic Decomposition of Benzene Over Silica Supported Cobalt Catalysts. *Fullerene Sci Techn.* 6, 853–866.

Dröge, W., **2002**. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 82, 47–95.

Du, J., Wang, S., You, H., Zhao, X., **2013**. Understanding the toxicity of carbon nanotubes in the environment is crucial to the control of nanomaterials in producing and processing and the assessment of health risk for human: A review. *Environ Toxicol Phar.* 36, 451–462.

Ebbesen, T.W., Ajayan, P. M., **1992**. Large-scale synthesis of carbon nanotubes. *Nature*. 358, 220–222.

Ebbesen, T.W., Hiura, H., Fujita, J., Ochiai, Y., Matsui, S., Tanigaki, K., **1993**. Patterns in the bulk growth of carbon nanotubes. *Chem Physics Lett.* 209, 83–90.

Edgington, A.J., Roberts, A.P., Taylor, L.M., Alloy, M.M., Reppert, J., Rao, A.M., Mao, J., Klaine, S.J., **2010**. The influence of natural organic matter on the toxicity of multiwalled carbon nanotubes. *Environ Toxicol Chem.* 29, 2511–2518.

- Endo, M., Strano, M., Ajayan, P., **2008**. Potential Applications of Carbon Nanotubes. *Carbon Nanotubes*. 111, 13–62.
- Eriyamremu, G.E., Osagie, V.E., Omoregie, S.E., Omofoma, C.O., **2008**. Alterations in glutathione reductase, superoxide dismutase, and lipid peroxidation of tadpoles (*Xenopus laevis*) exposed to Bonny Light crude oil and its fractions. *Ecotox Environ Safe*. 71, 284–290.
- Ferreira, J.L.R., Barros, D.M., Geracitano, L.A., Fillmann, G., Fossa, C.E., De Almeida, E.A., De Castro Prado, M., Neves, B.R.A., Pinheiro, M.V.B., Monserrat, J.M., **2012**. In vitro exposure to fullerene C60 influences redox state and lipid peroxidation in brain and gills from *Cyprinus carpio* (Cyprinidae). *Environmental Toxicology and Chem*. 31, 961–967.
- Fisher, A.B., Dodia, C., Manevich, Y., Chen, J.W., Feinstein, S.I., **1999**. Phospholipid hydroperoxides are substrates for non-selenium glutathione peroxidase. *J. Biol. Chem*. 274, 21326–21334.
- Folkmann, J.K., Risom, L., Jacobsen, N.R., Wallin, H., Loft, S., Møller, P., **2009**. Oxidatively damaged DNA in rats exposed by oral gavage to C60 fullerenes and single-walled carbon nanotubes. *Environ. Health Perspect*. 117, 703–708.
- Galloway, T., Lewis, C., Dolciotti, I., Johnston, B.D., Moger, J., Regoli, F., **2010**. Sublethal toxicity of nano-titanium dioxide and carbon nanotubes in a sediment dwelling marine polychaete. *Environmental Pollut*. 158, 1748–1755.
- Ghafari, P., St-Denis, C.H., Power, M.E., Jin, X., Tsou, V., Mandal, H.S., Bols, N.C., Tang, X., **2008**. Impact of carbon nanotubes on the ingestion and digestion of bacteria by ciliated protozoa. *Nat Nano* 3, 347–351.
- Gottschalk, F., Sonderer, T., Scholz, R.W., Nowack, B., **2009**. Modeled Environmental Concentrations of Engineered Nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for Different Regions. *Environ. Sci. Technol*. 43, 9216–9222.
- Govindaraj, A., Flahaut, E., Laurent, C., Peigney, A., Rousset, A., Rao, C.N.R., **1999**. An investigation of carbon nanotubes obtained from the decomposition of methane over reduced Mg_{1-x}M_xAl₂O₄ spinel catalysts. *J Mater Res*. 14, 2567–2576.
- Grüneis, A., Rummeli, M.H., Kramberger, C., Barreiro, A., Pichler, T., Pfeiffer, R., Kuzmany, H., Gemming, T., Büchner, B., **2006**. High quality double wall carbon nanotubes with a defined diameter distribution by chemical vapor deposition from alcohol. *Carbon*. 44, 3177–3182.
- Guichardant, M., Bacot, S., Molière, P., Lagarde, M., **2006**. Les biomarqueurs de la peroxydation lipidique. *OCL*. 13, 31–34.
- Guo, J., Zhang, Xiao, Zhang, S., Zhu, Y., Li, W., **2008**. The Different Bio-Effects of Functionalized Multi-Walled Carbon Nanotubes on *tetrahymena pyriformis*. *Curr Nanosci*. 4, 240–245.
- Guo, T., Nikolaev, P., Thess, A., Colbert, D. T., Smalley, R. E., **1995**. Catalytic growth of single-walled nanotubes by laser vaporization. *Chem Phys Lett*. 243, 49–54.

Hafner, J., Bronikowski, M., Azamian, B., Nikolaev, P., Rinzler, A., Colbert, D., Smith, K., Smalley, R., **1998**. Catalytic growth of single-wall carbon nanotubes from metal particles. *Chem Phys Lett.* 296, 195–202.

Hall, A., Karplus, P.A., Poole, L.B., 2009. Typical 2-Cys Peroxiredoxins: Structures, mechanisms and functions. *FEBS J.* 276, 2469–2477.

Hernadi, K., Fonseca, A., Nagy, J.B., Bernaerts, D., Riga, J., Lucas, A., **1996**. Catalytic synthesis and purification of carbon nanotubes. *Synthetic Met.* 77, 31–34.

Hirsch, A., **2002**. Functionalization of Single-Walled Carbon Nanotubes. *Angewandte Chemie International Edition.* 41, 1853–1859.

Hu, C., Cai, Y., Wang, W., Cui, Y., Li, Mei, **2013**. Toxicological effects of multi-walled carbon nanotubes adsorbed with nonylphenol on earthworm *Eisenia fetida*. *Environ Science: Proc Impa.* 15, 2125-2130.

Huang, L., White, B., Sfeir, M.Y., Huang, M., Huang, H.X., Wind, S., Hone, J., O'Brien, S., **2006**. Cobalt Ultrathin Film Catalyzed Ethanol Chemical Vapor Deposition of Single-Walled Carbon Nanotubes. *J. Phys. Chem.* 110, 11103–11109.

Iijima, S., **1991**. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature.* 354, 56–58.

Iijima, S., Brabec, C., Maiti, A., Bernholc, J., **1996**. Structural flexibility of carbon nanotubes. *J Chem Phys.* 104, 2089–2092.

Iijima, S., Ichihashi, T., **1993**. Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter. *Nature.* 363, 603–605.

Janez P., **2011**. Recommandation n° 2011/696/UE du 18/10/11 relative à la définition des nanomatériaux.

Jang, H.H., Lee, K.O., Chi, Y.H., Jung, B.G., Park, S.K., Park, J.H., Lee, J.R., Lee, S.S., Moon, J.C., Yun, J.W., Choi, Y.O., Kim, W.Y., Kang, J.S., Cheong, G.-W., Yun, D.-J., Rhee, Sue Goo, Cho, M.J., Lee, S.Y., **2004**. Two enzymes in one; two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function. *Cell.* 117, 625–635.

Jose-Yacamán, M., Miki-Yoshida, M., Rendon, L., Santiesteban, J. G., **1993**. Catalytic growth of carbon microtubules with fullerene structure. *Appl Phys Lett.* 62, 202–204.

Journet, C., Maser, W.K., Bernier, P., Loiseau, A., De la Chapelle, M.L., Lefrant, S., Deniard, P., Lee, R., Fischer, J.E., **1997**. Large-scale production of single-walled carbon nanotubes by the electric-arc technique. *Nature.* 388, 756–758.

Jovanović, B., Anastasova, L., Rowe, E.W., Palić, D., **2011**. Hydroxylated fullerenes inhibit neutrophil function in fathead minnow (*Pimephales promelas* Rafinesque, 1820). *Aquat Toxicol.* 101, 474–482.

Kang, S., Mauter, M.S., Elimelech, M., **2009**. Microbial cytotoxicity of carbon-based nanomaterials: implications for river water and wastewater effluent. *Environ Sci Technol.* 43, 2648–2653.

Kennedy, A.J., Hull, M.S., Steevens, J.A., Dontsova, K.M., Chappell, M.A., Gunter, J.C., Weiss, C.A., Jr, **2008**. Factors influencing the partitioning and toxicity of nanotubes in the aquatic environment. *Environ Toxicol Chem.* 27, 1932–1941.

Khodakovskaya, M., Dervishi, E., Mahmood, M., Xu, Y., Li, Z., Watanabe, F., Biris, A.S., **2009**. Carbon nanotubes are able to penetrate plant seed coat and dramatically affect seed germination and plant growth. *ACS Nano.* 3, 3221–3227.

Kim, K., Kim, I.H., Lee, K.Y., Rhee, S G, Stadtman, E.R., **1988**. The isolation and purification of a specific “protector” protein which inhibits enzyme inactivation by a thiol/Fe(III)/O₂ mixed-function oxidation system. *J Biol Chem.* 263, 4704–4711.

Kim, K.-T., Edgington, A.J., Klaine, S.J., Cho, J.-W., Kim, S.D., **2009**. Influence of multiwalled carbon nanotubes dispersed in natural organic matter on speciation and bioavailability of copper. *Environ Sci Technol.* 43, 8979–8984.

Klaine J.S., Alvarez, P.J.J., Batley, G.E., Fernandes, T.F., Handy, R.D., Lyon, D.Y., Mahendra, S., McLaughlin, M.J., Lead, J.R., **2008**. Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environ Toxicol Chem.* 27, 1825–51.

Knoops, B., Loumaye, E., Eecken, V.V.D., **2007**. Evolution of the Peroxiredoxins. *Subcell Biochem.* 44, 27–40.

Larue, C., Pinault, M., Czarny, B., Georgin, D., Jaillard, D., Bendiab, N., Mayne-L’Hermite, M., Taran, F., Dive, V., Carrière, Marie, **2012**. Quantitative evaluation of multi-walled carbon nanotube uptake in wheat and rapeseed. *J Hazard Mater.* 227–228, 155–163.

Lee, J.K., Sayers, B.C., Chun, K.-S., Lao, H.-C., Shipley-Phillips, J.K., Bonner, J.C., Langenbach, R., **2012**. Multi-walled carbon nanotubes induce COX-2 and iNOS expression via MAP Kinase-dependent and -independent mechanisms in mouse RAW264.7 macrophages. *Part Fibre Toxicol.* 9, 14.

Li, M., Huang, C.P., **2011**. The responses of *Ceriodaphnia dubia* toward multi-walled carbon nanotubes: Effect of physical–chemical treatment. *Carbon.* 49, 1672–1679.

Lim, J.-H., Kim, Sung-Hwan, Lee, I.-C., Moon, C., Kim, Sung-Ho, Shin, D.-H., Kim, H.-C., Kim, J.-C., **2011**. Evaluation of Maternal Toxicity in Rats Exposed to Multi-Wall Carbon Nanotubes during Pregnancy. *Environ Health Toxicol.* 26.

Lin, C., Fugetsu, B., Su, Y., Watari, F., **2009a**. Studies on toxicity of multi-walled carbon nanotubes on Arabidopsis T87 suspension cells. *J Hazard Mater.* 170, 578–583.

Lin, S., Reppert, J., Hu, Q., Hudson, J.S., Reid, M.L., Ratnikova, T.A., Rao, A.M., Luo, H., Ke, P.C., **2009b**. Uptake, Translocation, and Transmission of Carbon Nanomaterials in Rice Plants. *Small.* 5, 1128–1132.

- Liu, X., Vinson, D., Abt, D., Hurt, R.H., Rand, D.M., **2009**. Differential Toxicity of Carbon Nanomaterials in *Drosophila*: Larval Dietary Uptake Is Benign, but Adult Exposure Causes Locomotor Impairment and Mortality. *Environ Sci Technol.* 43, 6357–6363.
- Long, Z., Ji, J., Yang, K., Lin, D., Wu, F., **2012**. Systematic and Quantitative Investigation of the Mechanism of Carbon Nanotubes' Toxicity toward Algae. *Environ Sci Technol.* 46, 8458–8466.
- Lovern, S.B., Klaper, R., **2006**. *Daphnia magna* mortality when exposed to titanium dioxide and fullerene (C60) nanoparticles. *Environ Toxicol Chem.* 25, 1132–1137.
- Lovern, S.B., Strickler, J.R., Klaper, R., **2007**. Behavioral and Physiological Changes in *Daphnia magna* when Exposed to Nanoparticle Suspensions (Titanium Dioxide, Nano-C60, and C60HxC70Hx). *Environ Sci Technol.* 41, 4465–4470.
- Manevich, Y., Feinstein, S.I., Fisher, A.B., **2004**. Activation of the antioxidant enzyme 1-CYS peroxiredoxin requires glutathionylation mediated by heterodimerization with pi GST. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101, 3780–3785.
- Masato Naya, N.K., **2012**. In vivo genotoxicity study of single-wall carbon nanotubes using comet assay following intratracheal instillation in rats. *Regul toxicol pharm.* 64, 124–9.
- McCord, J.M., Fridovich, I., **1969**. Superoxide dismutase, an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem.* 244, 6049–6055.
- Miaudet, P., **2007**. Structure et propriétés de fibres de nanotubes de carbone à haute énergie de rupture. Université Sciences et Technologies - Bordeaux I.
- Mills, G.C., **1959**. The Purification and Properties of Glutathione Peroxidase of Erythrocytes. *J Biol Chem.* 234, 502–506.
- Mondal, A., Basu, R., Das, S., Nandy, P., **2011**. Beneficial role of carbon nanotubes on mustard plant growth: an agricultural prospect. *J Nanopart Res.* 13, 4519–4528.
- Moschino, V., Nesto, N., Barison, S., Agresti, F., Colla, L., Fedele, L., Da Ros, L., **2014**. A preliminary investigation on nanohorn toxicity in marine mussels and polychaetes. *Sci Total Environ.* 468-469, 111–119.
- Mouchet, F., Landois, P., Datsyuk, V., Puech, P., Pinelli, E., Flahaut, Emmanuel, Gauthier, L., **2011**. International amphibian micronucleus standardized procedure (ISO 21427-1) for in vivo evaluation of double-walled carbon nanotubes toxicity and genotoxicity in water. *Environ Toxicol.* 26, 136–145.
- Mouchet, F., Landois, P., Flahaut, Emmanuel, Pinelli, E., Gauthier, L., **2007**. Assessment of the potential *in vivo* ecotoxicity of Double-Walled Carbon Nanotubes (DWNTs) in water, using the amphibian *Ambystoma mexicanum*. *Nanotoxicology.* 1, 149–156.
- Mouchet, F., Landois, P., Puech, P., Pinelli, E., Flahaut, Emmanuel, Gauthier, L., **2010**. Carbon nanotube ecotoxicity in amphibians: assessment of multiwalled carbon nanotubes and comparison with double-walled carbon nanotubes. *Nanomedicine-UK.* 5, 963–974.

Mouchet, F., Landois, P., Sarremejean, E., Bernard, G., Puech, P., Pinelli, E., Flahaut, Emmanuel, Gauthier, L., **2008**. Characterisation and in vivo ecotoxicity evaluation of doublewall carbon nanotubes in larvae of the amphibian *Xenopus laevis*. *Aquat Toxicol.* 87, 127–137.

Muller, J., Decordier, I., Hoet, P.H., Lombaert, N., Thomassen, L., Huaux, F., Lison, D., Kirsch-Volders, M., **2008**. Clastogenic and aneugenic effects of multi-wall carbon nanotubes in epithelial cells. *Carcinogenesis*. 29, 427–433.

Muller, J., Delos, M., Panin, N., Rabolli, V., Huaux, F., Lison, D., **2012**. Absence of carcinogenic response to multiwall carbon nanotubes in a 2-year bioassay in the peritoneal cavity of the rat. *Toxicol Sci.* 128, 553–553.

Mwangi, J.N., Wang, N., Ingersoll, C.G., Hardesty, D.K., Brunson, E.L., Li, H., Deng, B., **2012**. Toxicity of carbon nanotubes to freshwater aquatic invertebrates. *Environ Toxicol Chem.* 31, 1823–1830.

Neves, V., Heister, E., Costa, S., Tîlmaciu, C., Flahaut, E., Soula, B., Coley, H. M., McFadden, J., Silva, S. R. P., **2012**. Design of double-walled carbon nanotubes for biomedical applications. *Nanotechnology*. 23, 365102.

Nieuwkoop, P.D. and Faber, J., **1956**. Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin) – a systematical and chronological survey of the development from the fertilized egg till the end of metamorphosis, North-Holland Publishing Company for the Ubrecht Laboratory Utrecht. ed. Amsterdam.

Nowack, B., Ranville, J.F., Diamond, S., Gallego-Urrea, J.A., Metcalfe, C., Rose, Jerome, Horne, N., Koelmans, Albert A., Klaine, S.J., **2012**. Potential scenarios for nanomaterial release and subsequent alteration in the environment. *Environ Toxicol Chem.* 31, 50–59.

Oberdörster, E., **2004**. Manufactured nanomaterials (fullerenes, C60) induce oxidative stress in the brain of juvenile largemouth bass. *Environ Health Perspect.* 112, 1058–1062.

Oberdörster, E., Zhu, S., Blickley, T.M., McClellan-Green, P., Haasch, M.L., **2006**. Ecotoxicology of carbon-based engineered nanoparticles: Effects of fullerene (C60) on aquatic organisms. *Toxicol Carbon Nanomat.* 44, 1112–1120.

Oberdörster, G., Maynard, A., Donaldson, K., Castranova, V., Fitzpatrick, J., Ausman, K., Carter, J., Karn, B., Kreyling, W., Lai, D., Olin, S., Monteiro-Riviere, N., Warheit, D., Yang, H., **2005**. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Part Fibre Toxicol.* 2, 8.

Ostiguy, C., Soucy, B., Lapointe, G., Woods, C., Ménard, L., Trottier, M., **2008**. Les effets sur la santé reliés aux nanoparticules [internet]. Available from: <http://www.irsst.qc.ca>.

Palomäki, J., Välimäki, E., Sund, J., Vippola, M., Clausen, P.A., Jensen, K.A., Savolainen, K., Matikainen, S., Alenius, H., **2011**. Long, needle-like carbon nanotubes and asbestos activate the NLRP3 inflammasome through a similar mechanism. *ACS Nano.* 5, 6861–6870.

- Park, E.-J., Zahari, N.E.M., Lee, E.-W., Song, J., Lee, J.-H., Cho, M.-H., Kim, J.-H., **2014**. SWCNTs induced autophagic cell death in human bronchial epithelial cells. *Toxicol in Vitro*. 28, 442–450.
- Patel V., **2011**. Global Carbon Nanotubes Market Outlook: Industry Beckons. 2, 31–35.
- Peigney, A., Laurent, C., Dobigeon, F., Rousset, A., **1997**. Carbon nanotubes grown in situ by a novel catalytic method. *J Mater Res*. 12, 613–615.
- Peigney, A., Laurent, C., Flahaut, E., Bacsá, R.R., Rousset, A., **2001**. Specific surface area of carbon nanotubes and bundles of carbon nanotubes. *Carbon*. 39, 507–514.
- Pérez-Campo, R., López-Torres, M., Rojas, C., Cadenas, S., Barja, G., **1993**. A comparative study of free radicals in vertebrates, I. Antioxidant enzymes. *Comp Biochem Physiol B*. 105, 749–755.
- Petersen, E.J., Nelson, B.C., **2010**. Mechanisms and measurements of nanomaterial-induced oxidative damage to DNA. *Anal Bioanal Chem*. 398, 613–650.
- Philbrook, N.A., Walker, V.K., Afrooz, M.N., Saleh, N.B., Winn, L.M., **2011**. Investigating the effects of functionalized carbon nanotubes on reproduction and development in *Drosophila melanogaster* and CD-1 mice. *Reprod Toxicol*. 32, 442–448.
- Pichardo, S., Gutiérrez-Praena, D., Puerto, M., Sánchez, E., Grilo, A., Cameán, A.M., Jos, Á., **2012**. Oxidative stress responses to carboxylic acid functionalized single wall carbon nanotubes on the human intestinal cell line Caco-2. *Toxicol in Vitro*. 26, 672–677.
- Qu, R., Wang, X., Wang, Z., Wei, Z., Wang, L., **2014**. Metal accumulation and antioxidant defenses in the freshwater fish *Carassius auratus* in response to single and combined exposure to cadmium and hydroxylated multi-walled carbon nanotubes. *J Hazard Mater*. 275, 89–98.
- Queisser, N., Schupp, N., **2012**. Aldosterone, oxidative stress, and NF- κ B activation in hypertension-related cardiovascular and renal diseases. *Free Radical Bio Med*. 53, 314–327.
- Ravichandran, P., Baluchamy, S., Gopikrishnan, R., Biradar, S., Ramesh, V., Goornavar, V., Thomas, R., Wilson, B.L., Jeffers, R., Hall, J.C., Ramesh, G.T., **2011**. Pulmonary Biocompatibility Assessment of Inhaled Single-wall and Multiwall Carbon Nanotubes in BALB/c Mice. *J Biol Chem*. 286, 29725–29733.
- Rhee, Sue Goo, Chae, H.Z., Kim, Kanghwa, **2005**. Peroxiredoxins: A historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radical Bio Med*. 38, 1543–1552.
- Roberts, A.P., Mount, A.S., Seda, B., Souther, J., Qiao, R., Lin, S., Ke, P.C., Rao, A.M., Klaine, S.J., **2007**. In vivo Biomodification of Lipid-Coated Carbon Nanotubes by *Daphnia magna*. *Environ Sci Technol*. 41, 3025–3029.
- Roy, M., Sonkar, S.K., Tripathi, S., Saxena, M., Sarkar, Sabyasachi, **2012**. Non-toxicity of water soluble multi-walled carbon nanotube on *Escherichia coli* colonies. *J Nanosci Nanotechnol*. 12, 1754–1759.

Sanz, V., Tilmaci, C., Soula, Brigitte, Flahaut, Emmanuel, Coley, Helen M., Silva, S. Ravi P., McFadden, J., **2011**. Chloroquine-enhanced gene delivery mediated by carbon nanotubes. *Carbon*. 49, 5348–5358.

Savas Berber, Y.-K.K., **2000**. Unusually High Thermal Conductivity of Carbon Nanotubes. *Phys Rev Lett*. 84, 4613–4616.

Saxena, S., Gomber, C., Raina, K.K., **2009**. Effect of multi-walled carbon nanotubes on viability and superoxide dismutase expression in human wound pathogens. *Int J Nanosci*. 8, 415–423.

Sayers, B.C., Taylor, A.J., Glista-Baker, E.E., Shipley-Phillips, J.K., Dackor, R.T., Edin, M.L., Lih, F.B., Tomer, K.B., Zeldin, D.C., Langenbach, R., Bonner, J.C., **2013**. Role of Cyclooxygenase-2 in Exacerbation of Allergen-Induced Airway Remodeling by Multiwalled Carbon Nanotubes. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 49, 525–535.

Schneider, J.J., Czap, N., Hagen, J., Engstler, J., Ensling, J., Gtlich, P., Reinoehl, U., Bertagnolli, H., Luis, F., De Jongh, L.J., Wark, M., Grubert, G., Hornyak, G.L., Zaroni, R., **2000**. Metallorganic Routes to Nanoscale Iron and Titanium Oxide Particles Encapsulated in Mesoporous Alumina: Formation, Physical Properties, and Chemical Reactivity. *Chem*. 6, 4305–4321.

Schwab, F., Bucheli, T.D., Lukhele, L.P., Magrez, A., Nowack, B., Sigg, L., Knauer, K., **2011**. Are Carbon Nanotube Effects on Green Algae Caused by Shading and Agglomeration. *Environ Sci Technol*. 45, 6136–6144.

Scott-Fordsmand, J.J., Krogh, P.H., Schaefer, M., Johansen, A., **2008**. The toxicity testing of double-walled nanotubes-contaminated food to *Eisenia veneta* earthworms. *Ecotoxicol Environ Saf*. 71, 616–619.

Seichepine, F., Salomon, S., Collet, M., Guillon, S., Nicu, L., Larrieu, G., Flahaut, Emmanuel, Vieu, C., **2012**. A combination of capillary and dielectrophoresis-driven assembly methods for wafer scale integration of carbon-nanotube-based nanocarpets. *Nanotechnology*. 23, 095303.

Shahid, M., **2010**. Induction de la phytotoxicit du Plomb chez *Vicia faba* L. : rles de l'absorption et de la spciation. [thse], Toulouse, INPT.

Sharapov, M.G., Novoselov, V.I., Fesenko, E.E., Ravin, V.K., **2011**. Two isoforms of peroxiredoxin 6 of *Xenopus laevis*. *Mol Biol*. 45, 933–940.

Sharma, C.S., Sarkar, S., Periyakaruppan, A., Barr, J., Wise, K., Thomas, R., Wilson, B.L., Ramesh, G.T., **2007**. Single-Walled Carbon Nanotubes Induces Oxidative Stress in Rat Lung Epithelial Cells. *J Nanosci Nanotechno*. 7, 2466–2472.

Shvedova, A A, Kisin, E., Murray, A R, Johnson, V J, Gorelik, O, Arepalli, S, Hubbs, A F, Mercer, R.R., Keohavong, P., Sussman, N., Jin, J., Yin, J., Stone, S., Chen, B.T., Deye, G., Maynard, A., Castranova, P.A., Kagan, V E, **2008**. Inhalation vs. aspiration of single-walled carbon nanotubes in C57BL/6 mice: inflammation, fibrosis, oxidative stress, and mutagenesis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 295, 552–565.

Shvedova, A., Pietroiusti, A., Fadeel, B., Kagan, Valerian E, **2012**. Mechanisms of carbon nanotube-induced toxicity: focus on oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol*. 261, 121–133.

Shvedova, A., Kisin, E.R., Mercer, R., Murray, A.R., Johnson, V.J., Potapovich, A.I., Tyurina, Y.Y., Gorelik, O., Arepalli, S., Schwegler-Berry, D., Hubbs, F., Antonini, J., Evans, D.E., Ku, B.-K., Ramsey, D., Maynard, A., Kagan, V.E., Castranova, V., Baron, P., **2005**. Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary responses to single-walled carbon nanotubes in mice. *Am J Physiol- Lung C*. 289, 698–708.

Simon-Deckers, A., Gouget, B., Mayne-L’Hermite, M., Herlin-Boime, N., Reynaud, C., Carrière, M., **2008**. In vitro investigation of oxide nanoparticle and carbon nanotube toxicity and intracellular accumulation in A549 human pneumocytes. *Toxicology*. 253, 137–146.

Smith, C.J., Shaw, B.J., Handy, R.D., **2007**. Toxicity of single walled carbon nanotubes to rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): respiratory toxicity, organ pathologies, and other physiological effects. *Aquat Toxicol*. 82, 94–109.

Smith, W.L., Langenbach, R., **2001**. Why there are two cyclooxygenase isozymes. *J Clin Invest*. 107, 1491–1495.

Sukhija, H., **2011**. Inhaled Single Walled Carbon Nanotubes induce Pulmonary Inflammation in Hamsters with an Increase in 5-Lipoxygenase and Leukotriene B4 Levels. [these], St John’s University (New York), School Of Pharmacy.

Taniguchi, N., Higashi, T., Sakamoto, Y., Meister, A., **2012**. Glutathione Centennial: Molecular Perspectives and Clinical Implications. 1988, Osaka, Japan.

Templeton, R.C., Ferguson, P.L., Washburn, K.M., Scrivens, W.A., Chandler, G.T., **2006**. Life-cycle effects of single-walled carbon nanotubes (SWNTs) on an estuarine meiobenthic copepod. *Environ. Sci Technol*. 40, 7387–7393.

Thannickal, V.J., Fanburg, B.L., **2000**. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 279, 1005–1028.

Thess, Lee, Nikolaev, Dai, Petit, Robert, Xu, Lee, Kim, Rinzler, Colbert, Scuseria, Tomanek, Fischer, Smalley, **1996**. Crystalline Ropes of Metallic Carbon Nanotubes. *Science*. 273, 483–487.

Tinguely C., **2012**. Réalisation d’interconnexions de faible résistivité à base de nanotubes de carbone biparois pour la nano-électronique. [thèse], Université Paul Sabatier, Toulouse.

Usenko, C.Y., 2007. In vivo assessment of nanomaterial-induced toxicity using embryonic zebrafish. [Thèse], Oregon State University.

Usenko, C., Harper, S., Tanguay, R., **2008**. Fullerene C60 exposure elicits an oxidative stress response in embryonic zebrafish. *Toxicol Appl Pharmacol*. 229, 44–55.

Van der Zande, M., Junker, R., Walboomers, X.F., Jansen, J.A., 2011. Carbon nanotubes in animal models: a systematic review on toxic potential. *Tissue Eng Part B Rev*. 17, 57–69.

Velzeboer, I., Peeters, E.T.H.M., Koelmans, A. A., **2013**. Multiwalled carbon nanotubes at environmentally relevant concentrations affect the composition of benthic communities. *Environ. Sci. Technol.* 47, 7475–7482.

Wang, C., Liu, H., Chen, J., Tian, Y., Shi, J., Li, D., Guo, C., Ma, Q., **2014**. Carboxylated multi-walled carbon nanotubes aggravated biochemical and subcellular damages in leaves of broad bean (*Vicia faba* L.) seedlings under combined stress of lead and cadmium. *J Hazard Mat.* 274, 404–412.

Wei, L., Thakkar, M., Chen, Y., Ntim, S.A., Mitra, S., Zhang, X., **2010**. Cytotoxicity effects of water dispersible oxidized multiwalled carbon nanotubes on marine alga, *Dunaliella tertiolecta*. *Aquat Toxicol.* 100, 194–201.

Wiesner, M.R., Lowry, G.V., Alvarez, P., Dionysiou, D., Biswas, P., **2006**. Assessing the risks of manufactured nanomaterials. *Environ Sci Technol.* 40, 4336–4345.

Witzmann, F.A., Monteiro-Riviere, N.A., **2006**. Multi-walled carbon nanotube exposure alters protein expression in human keratinocytes. *Nanomed-Nanotechnol.* 2, 158–168.

Wood, Z.A., Schröder, E., Robin H., J., Poole, L.B., **2003**. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends in Biochem Sci.* 28, 32–40.

Woodrow Wilson International Center for Scholars, Pew Charitable Trusts. The Project of Emerging Nanotechnologies [Internet]. Available from: www.nanotechproject.org

Yang, K., Jing, Q., Wu, W., Zhu, L., Xing, B., **2010**. Adsorption and conformation of a cationic surfactant on single-walled carbon nanotubes and their influence on naphthalene sorption. *Environ Sci Technol.* 44, 681–687.

Yao, Z., Kane, C., Dekker, C., **2000**. High-Field Electrical Transport in Single-Wall Carbon Nanotubes. *Phys Rev Lett.* 84, 2941–2944.

Yuan, J., Gao, H., Ching, C.B., **2011**. Comparative protein profile of human hepatoma HepG2 cells treated with graphene and single-walled carbon nanotubes: An iTRAQ-coupled 2D LC–MS/MS proteome analysis. *Toxicol Lett.* 207, 213–221.

Zhang, L., Hu, C., Wang, W., Ji, F., Cui, Y., Li, Mei, **2014**. Acute toxicity of multi-walled carbon nanotubes, sodium pentachlorophenate, and their complex on earthworm *Eisenia fetida*. *Ecotox Environ Safe.* 103, 29–35.

Zheng, L.X., O’Connell, M.J., Doorn, S.K., Liao, X.Z., Zhao, Y.H., Akhadov, E.A., Hoffbauer, M.A., Roop, B.J., Jia, Q.X., Dye, R.C., Peterson, D.E., Huang, S.M., Liu, J., Zhu, Y.T., **2004**. Ultralong single-wall carbon nanotubes. *Nat Mater.* 3, 673–676.

Zhu, L., Chang, D.W., Dai, L., Hong, Y., **2007a**. DNA Damage Induced by Multiwalled Carbon Nanotubes in Mouse Embryonic Stem Cells. *Nano Letters.* 7, 3592–3597.

Zhu, S., Oberdörster, E., Haasch, M.L., **2006**. Toxicity of an engineered nanoparticle (fullerene, C60) in two aquatic species, *Daphnia* and fathead minnow. *Mar. Environ. Res.* 62 Suppl, 5–9.

Zhu, X., Zhu, L., Chen, Y., Tian, S., **2009a**. Acute toxicities of six manufactured nanomaterial suspensions to *Daphnia magna*. *J Nanopart Res.* 11, 67–75.

Zhu, X., Zhu, L., Li, Y., Duan, Z., Chen, W., Alvarez, P.J.J., **2007b**. Developmental toxicity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos after exposure to manufactured nanomaterials: Buckminsterfullerene aggregates (nC60) and fullerol. *Environ Toxicol Chem.* 26, 976–979.

Zhu, Y., Li, W., Li, Q., Li, Y., Li, Y., Zhang, X., Huang, Q., **2009b**. Effects of serum proteins on intracellular uptake and cytotoxicity of carbon nanoparticles. *Carbon.* 47, 1351–1358.

Chapitre II : présentation du modèle biologique et des conditions d'exposition aux NTCMW

Ce chapitre est consacré à la présentation de l'espèce modèle *Xenopus laevis* utilisée dans le cadre de ces travaux. Les conditions de reproduction et d'élevage des amphibiens ainsi que les protocoles d'exposition des larves qui ont servi pour nos expériences seront également abordés. Le dernier paragraphe sera consacré à la gestion des déchets contaminés par les NTC.

I. Le modèle biologique : l'amphibien *Xenopus laevis*

Originaire d'Afrique australe, le Xénope commun (*Xenopus laevis*), crapaud à griffe ou encore appelé dactylère du Cap, appartient à la classe des Amphibiens, invertébrés tétrapodes à température variable et à peau nue. Cette espèce appartient plus précisément à l'ordre des anoures regroupant les grenouilles et les crapauds ayant un corps trapu et dépourvu de queue à l'état adulte et à la famille des *pipidae*, amphibiens primitifs dépourvus de langue.

Cette espèce possède un mode de vie essentiellement aquatique, ne remontant à la surface de l'eau que pour respirer. La maturité sexuelle est atteinte un peu avant deux ans. Les femelles adultes mesurent de 9 à 12 cm et les mâles adultes de 7 à 8 cm (**figure II.1.A**).

Xenopus laevis est une espèce ovipare, en effet la femelle expulse des œufs regroupés en grappes (**figure II.1.B**) de plusieurs dizaines d'ovocytes que le mâle va arroser simultanément de sa semence. On parle dans ce cas de fécondation externe.

Le développement du xénope (de l'œuf à l'adulte) est subdivisé en 66 stades (Nieuwkoop and Faber, 1994) qui se caractérisent par des événements morphologiques, cellulaires et moléculaires. Au terme du développement embryonnaire, intra-ovulaire, un bourgeon caudal éclot et se transforme en larve libre et nageuse, étant chez les anoures appelée têtard (à cause de sa grosse tête fusionnée à un tronc globuleux).

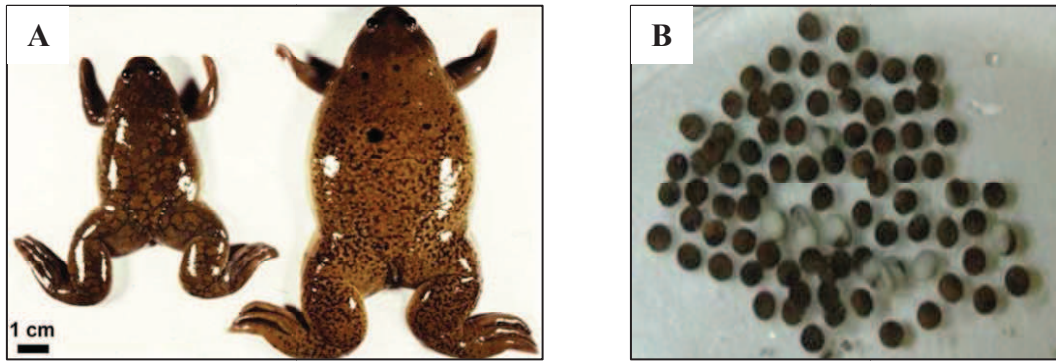


Figure II.1: *Xenopus laevis* : (A) couple d'adultes (femelle à droite et mâle à gauche) (Landois, 2008) et (B) œufs (ovocytes fécondés entourés de leur gangue) (Bourdiol, 2013)

Ainsi débute la pré-métamorphose, qui se caractérise principalement par un accroissement de la taille de la larve au cours duquel les membres postérieurs demeurent de simples bourgeons et les membres antérieurs restent logés dans les cavités branchiales qui recouvrent les replis operculaires. Des modifications morphologiques et anatomiques s'opèrent ensuite durant la métamorphose des larves. Elles conduisent à leur transformation en juvéniles, semblables aux adultes (**figure II.2**).

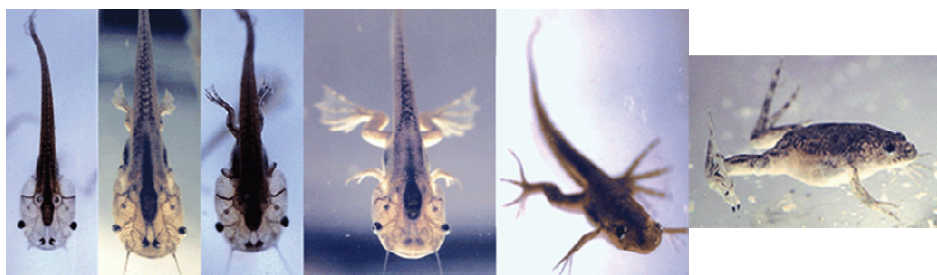


Figure II.2 : Illustration de la métamorphose des larves de xénope jusqu'à l'obtention du stade juvénile en vue dorsale (Bourdiol, 2013).

Comme nous le verrons par la suite, nos expérimentations ont été réalisées sur des larves au stade 50 ou 54 (**figure II.3.A, II.3.B et II.4**) selon la classification de Nieuwkoop and Faber (NIEUWKOOP, P.D. & FABER, J, 1956).

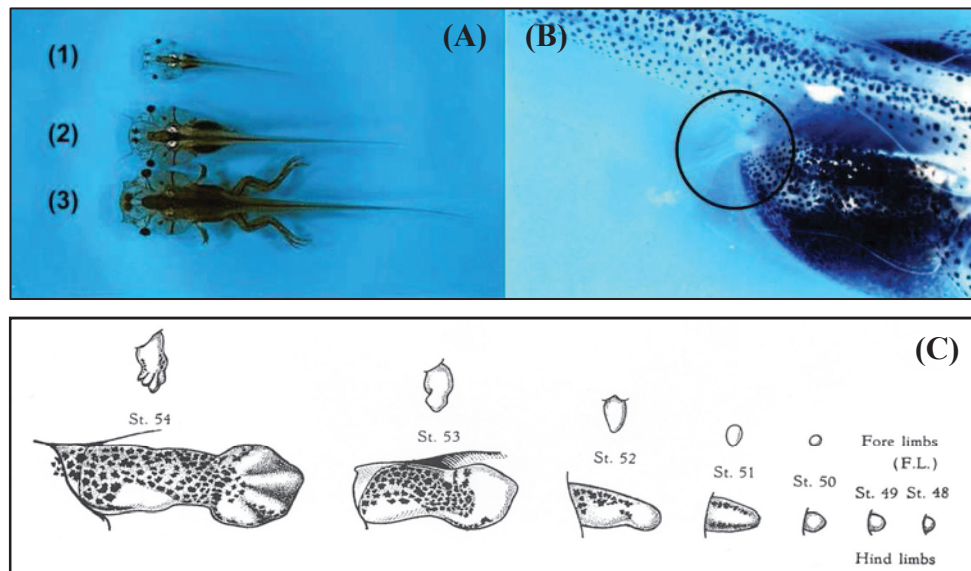


Figure II.3 : (A) Photographie en vue dorsale de larves de xénope (1) au stade 50, (2) au stade 54 et (3) en début de métamorphose. (B) Détail du membre postérieur d'une larve au stade 50 (Landois, 2008). (C) Schéma du bourgeonnement des membres postérieurs de larves de *X. laevis* du stade 48 au stade 54 selon la classification de Nieuwkoop and Faber (Nieuwkoop and Faber, 1956).

L'anatomie générale d'une larve de *X. laevis* est présentée sur la **figure II.4**. La tête et la queue de la larve sont transparentes et ponctuées de chromatophores, cellules chargées de pigments noirs, qu'il convient de ne pas confondre (à l'œil nu) avec des NTC. Cette pigmentation est plus intense au niveau du cerveau et des organes olfactifs. L'intestin, sous forme hélicoïdale, n'est pas directement visible mais protégé par une membrane argentée.



Figure II.4: Anatomie générale d'une larve de *X.laevis* (Bourdiol, 2013).

II. Elevage de l'amphibien *Xenopus laevis*

II.1. Elevage des adultes reproducteurs

Les adultes utilisés pour nos expériences sont maintenus dans une pièce thermostatée permettant de maintenir une température ambiante à $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ et une alternance jour/nuit de l'éclairage assurée par une horloge avec une périodicité de 8h/16h. Au sein de cette pièce les animaux sont maintenus dans des bacs équipés d'un couvercle grillagé pour éviter leur fuite. Chaque bac est rempli au 2/3 avec une eau potable issue de la distribution de la commune d'Auzeville-Tolosane (31320), traitée par ultraviolets et filtrée à travers du charbon actif (Veolia Water, France [E300CA-7003]). L'eau des aquariums est renouvelée une fois par semaine. Les animaux sont nourris deux fois par semaine par des granulés spécialement conçus pour l'élevage du Xénope (TetraPhyll[®]).

II.2. Reproduction *in vivo* et élevage des larves jusqu'au stade 50 et 54

Après sélection, les adultes reproducteurs sont placés dans un bac rempli d'eau. Les pontes sont obtenues par accouplement naturel après fécondation *in vivo* induite par une injection de

750 UI de gonadotrophine chorionique 1500 [HCG (Hormone Chorionique gonadotrope), Organon, France, [9002–61–3]] pour la femelle et de 50 UI de gonadotrophine sérique équine 500 (PMSG ; Pregnant Mare’s Serum Gonadotropin), France, [9002–70–4]] pour le mâle. Ces hormones sont injectées dans les sacs lymphatiques de chaque animal (**figure II.5.B**).

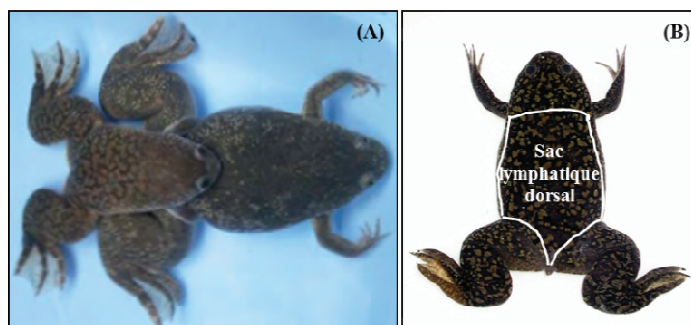


Figure II.5: (A) Accouplement de xénopes adultes, pendant lequel le mâle (à gauche) est accroché à la femelle (à droite) par la ceinture pelvienne (amplexus) (Bourdiol, 2013). (B) Position des sacs lymphatiques dorsaux d'une femelle *Xenopus laevis* (Landois, 2008).

Lors de l'accouplement, le mâle (30% plus petit que la femelle) s'accroche à celle-ci au niveau de la ceinture pelvienne (**figure II.5.A**). Cette position (amplexus) permet aux ovocytes, expulsés périodiquement par la femelle sous forme de grappes, d'être aussitôt fécondés par le mâle (fécondation externe). 12 à 15 h sont nécessaires pour que les premiers ovocytes soient libérés. 48 h après l'injection, les adultes reproducteurs sont séparés et placés à l'extérieur du bac de fécondation. Ils pourront être réutilisés pour une fécondation ultérieure après 3 mois de repos.

Les œufs (mesurant de 1,2 à 1,3 mm de diamètre) fécondés et viables sont transférés dans un aquarium rempli d'eau déminéralisée et enrichie en sels minéraux (**tableau II.1**). L'eau est maintenue à une température de $22 \pm 1^\circ\text{C}$ grâce à une résistance chauffante. Une oxygénation du milieu est assurée par un bullage artificiel placé au centre de l'aquarium.

Les larves issues de la fécondation sont microphages. Elles sont nourries quotidiennement avec du tetraphyll® finement moulu. La nourriture qui se dépose au fond de l'aquarium, ainsi que la microfaune qui se développe autour, sont broutées par les larves qui adoptent une position stationnaire oblique (45°, la tête tournée vers le fond). Bien que brouté en permanence par les larves, le fond de l'aquarium est nettoyé régulièrement par aspiration manuelle. Le niveau d'eau est ajusté si nécessaire.

Les larves sont maintenues dans ces conditions jusqu'à atteindre le stade approprié pour nos expérimentations [stade 50 ou 54 selon la table de classification de Nieuwkoop and Faber (NIEUWKOOP, P.D. & FABER, J, 1956)].

III. Evaluation de la toxicité des NTCMW vis-à-vis du model amphibien *X. laevis*

III.1. Protocole d'exposition des larves

Les expositions aux NTCMW sont réalisées sur des larves au stade 50 (bourgeonnement des membres postérieurs, rétrécies à leur base) ou 54 (formation complète des membres inférieurs et apparition des 4 doigts) [**figure II.3**]. Pour chaque expérience, les larves sont sélectionnées à partir d'une seule ponte afin de réduire la variabilité génétique entre les animaux. Des lots de 50 ou de 25 larves sont constitués et placés dans des cristallisoirs de 5 L contenant 2 L de milieux d'exposition.

Les larves sont exposées pendant 2, 4, 8, 12 et 24 h à une gamme de concentration de NTCMW allant de 0,1 à 10 mg/L, avec une exposition de lots dit témoins dans les conditions expérimentales suivantes :

- Conditions témoins négatifs (T-) : ce milieu est préparé à partir d'eau déminéralisée (ER), à laquelle sont rajoutés des sels minéraux en concentrations connues (**tableau II.1**).

- Conditions témoins positifs (T+) : dans ce milieu, les larves sont exposées à une substance organique mutagène de référence : le MMS (méthanesulfonate de méthyle, [66-27-3], Sigma, France; 6,24 mg/L).
- Condition en présence de NTCMW : ces milieux sont constitués d'ER à laquelle sont rajoutés différentes concentrations de NTCMW (0,1; 1 et 10 mg/L).

Tableau II.1: Composition de l'eau reconstituée.

Nature des sels	Concentration en mg/L
Chlorure de calcium ($\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$)	294
Sulfate de magnésium ($\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$)	123,25
Hydrogénocarbonate de sodium (NaHCO_3)	64,75
Chlorure de potassium (KCl)	5,6

Les essais ont lieu dans une pièce thermostatée, de façon à maintenir la température des milieux à $22 \pm 0,5$ °C et un éclairage selon un cycle nyctéméral (8 h de jour et 16 h de nuit).

L'ensemble des essais sont réalisés sur des temps courts (2, 4, 8, 12 et 24 h) et menés dans des conditions statiques (pas de changement de milieu) avec un apport journalier de nourriture (ISO, 2006, 2006).

III.2. Préparation des milieux d'exposition

Deux types de NTCMW ont été utilisés au cours de ces essais. Les NTC dit bruts (dispersion par bain à ultrason) et les NTC dispersés (dispersion par ajout de matière organique). Les différentes concentrations de NTC (0,1, 1 et 10 mg/L) sont fournies sous forme humide dans un volume total de 20 ml d'ER contenant la quantité appropriée de NTCMW (Graphistrength C100, Arkema France).

III.2.1. Dispersion des NTC par un bain à ultrason (NTC bruts)

Ce mode de dispersion consiste à placer les flacons de NTC contenant 20 mL de suspension dans un bain à ultrasons (Bioblock 89863, type 570 HF Fréquence 35 KHz, I: 0.73, Af: 50/60 HZ) pendant une durée de 5 minutes à puissance maximale. Les flacons sont ensuite récupérés puis leur contenu est transféré dans un cristalliseur de 5 L. Le volume est ajusté à 2 L avec de l'ER afin d'obtenir les concentrations souhaitées de 0,1; 1 ou 10 mg/L de NTCMW (Saria et al., 2014).

III.2.2. Dispersion des NTC par la matière organique « suwannee river » (NTC dispersés)

Ce type de dispersion nécessite l'utilisation d'une sonotrode (modèle vibra cell 75042, 20 kHz, 500 W, tige de 125 mm de diamètre). Cet appareil est équipé d'un générateur ultrasonique relié à un transducteur piézo-électrique. La tension du secteur est ainsi convertie en énergie électrique à haute fréquence, puis en énergie mécanique de même fréquence. Les vibrations mécaniques du convertisseur sont intensifiées par l'immersion de la sonde dans la suspension de NTC, créant des ondes de compression dans le liquide. Cette action génère des millions de bulles microscopiques qui se propagent pendant la phase de pression négative, et qui implosent violemment pendant la phase de pression positive. C'est ce phénomène appelé cavitation acoustique, qui dissipe une énergie considérable au niveau du point d'implosion, permettant ainsi une agitation intense à la pointe de la sonde.

L'agitation moléculaire de l'échantillon provoque généralement une élévation de la température, pouvant réduire la cavitation et induire des phénomènes de ré-agglomération des NTC. Le récipient contenant la suspension est donc immergé dans un bain de glace. Un cycle de pulsation, comprenant une phase de sonication de 5 sec (5 sec ON) suivie d'une phase de relaxation de 2 sec (*i.e.* arrêt de la sonication, 2 sec OFF) est appliqué.

Le protocole de dispersion des NTC par la matière organique nécessite deux étapes importantes :

Une première étape consiste à placer les échantillons de NTCMW (50 mg/L) sous la sonotrode à 35 % de son intensité maximale. Après 1 h de sonication un volume de 40 μ L est prélevé puis resuspendus dans 2 L d'ER afin d'obtenir une solution finale à 0,1 mg/L de NTCMW. On parle dans le cadre de cette expérience de NTC bruts. A l'issu de cette étape les NTC occupent un volume plus important et la suspension présente un aspect floconneux.

Au cours de la deuxième étape, les NTCMW issus de la première sonication sont mélangés à la matière organique «suwannee river». Un volume de 40 μ L de NTC est additionné à 200 μ L de MO (suspension à 1mg/L) puis ajusté avec de l'ER à 20 mL.

Le mélange NTC-ER-MO subit une deuxième sonication de 20 min (5 sec ON, 2 sec OFF, puissance de 35%). Cette solution est ensuite ajustée à 2 L par l'ajout d'ER. La suspension finale obtenue est à une concentration de 0,1 mg/L de NTCMW/MO (v/v). On parle dans le cadre de cette expérience de NTCMW dispersés.

Pour chaque condition expérimentale deux contrôles, représentés par des cristallisoirs contenant 2 L d'ER seule ou additionnée de 200 μ l de MO (1 mg/L), sont réalisés.

IV. Gestion des déchets contaminés par les nanotubes de carbone

Il n'existe à ce jour aucune réglementation concernant les déchets de NTC qu'ils soient sous forme brute, en suspension ou inclus dans un matériau. Les laboratoires de recherche et les industriels qui les utilisent ont pris comme habitude de les écarter de la filière des déchets classiques et réglementés, pour les faire incinérer à haute pression.

Au sein de notre laboratoire, le matériel solide à usage unique (eppendorfs, papier absorbant, gants, contenants plastique...) ayant eu un contact avec les NTC a été stocké dans des seaux en polypropylène (PP) réglementaires spécifiques. Chaque contenant a été identifié

et pris en charge par la société spécialisée Labo Service (Teris, Castelsarrasin) de manière à être incinérés. La verrerie et le matériel réutilisables sont, quant à eux, décontaminés par un traitement aux ultrasons.

Les milieux aqueux contaminés par des NTC (milieux d'exposition, eau de nettoyage) sont filtrés afin de réduire le volume à traiter. Les filtres papier (Fisherbrand W5171H- 11832727 ; diamètre de 150 mm, densité de 64g/m^2) ayant permis de récupérer les NTC ont été traités de manière similaire au matériel à usage unique souillé. Dans le cas particulier des suspensions et des milieux d'exposition pour lesquelles les NTC ont été dispersés à l'aide de la matière organique, les solutions sont stockées dans des bidons réglementaires. En effet, ces solutions contiennent des NTC individualisés capables de passer à travers les filtres et ne peuvent donc être traités selon le même protocole que les NTC bruts. Avant leur rejet, les suspensions de NTC dispersés ont été enrichies en ions divalents Ca^{2+} . Cette étape permet de désorber l'agent dispersant et provoquer ainsi la ré-agglomération des NTC (Yang et al., 2011). La filtration a lieu 24 à 48 h après l'ajout de CaCl_2 déshydraté (entre 5 et 10 g/L) et l'agitation manuelle de la suspension.

Références bibliographiques

Bourdiol, F., **2013**. Evaluation de l'écotoxicité de nanotubes de carbone en milieu aquatique à l'aide du modèle amphibien *Xenopus laevis* : synthèse, protocoles d'exposition, détection et dosage. [Thèse]. Université Paul Sabatier, Toulouse.

ISO 2006, **2006**. Qualité de l'eau - Evaluation de la génotoxicité par le mesurage de l'induction de micronoyaux – Partie 1 : Evaluation de la génotoxicité à l'aide de larves d'amphibiens (*Xenopus laevis*, *Pleurodeles waltl*).

Landois, P., **2008**. Synthèse, fonctionnalisation et impact sur l'environnement de nanotubes de carbone. [Thèse]. Université Paul Sabatier, Toulouse.

Nieuwkoop, P.D., Faber, J., **1956**. Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin) - a systematical and chronological survey of the development from the fertilized egg till the end of metamorphosis, North-Holland Publishing Company for the Ubrecht Laboratory Utrecht. ed. Amsterdam.

Saria, R., Mouchet, F., Perrault, A., Flahaut, E., Laplanche, C., Boutonnet, J.-C., Pinelli, E., Gauthier, L., **2014**. Short term exposure to multi-walled carbon nanotubes induce oxidative stress and DNA damage in *Xenopus laevis* tadpoles. *Ecotox Environ Safe*. 107, 22–29.

Yang, S.-T., Wang, H., Wang, Yunxia, Wang, Yanwen, Nie, H., Liu, Y., **2011**. Removal of carbon nanotubes from aqueous environment with filter paper. *Chemosphere*. 82, 621–626.

Chapitre III : mise en évidence de l'effet des NTCMW sur les larves de *Xenopus laevis*

I. Introduction

Au cours de leur cycle de vie, les NTC sont susceptibles d'être rejetés dans l'environnement et d'intégrer notamment le compartiment aquatique, connu pour être le réceptacle majeur des contaminants et d'interagir avec les organismes qui y sont présents.

Plusieurs scénarios de répartition des NTC dans le milieu aquatique sont possibles ils seraient majoritairement localisés au niveau des sédiments sous forme de faisceaux ou d'agglomérats (objets macroscopiques), mais également sous forme plus individualisée et en suspension dans la colonne d'eau notamment après leur interaction avec des composés organiques naturels, présents dans l'eau et agissant comme des agents dispersants.

Au vue de la production mondiale de NTC et les recherches consacrées à leur synthèse qui ne cessent d'augmenter, une meilleure connaissance de l'impact de ces nanoparticules carbonées est devenue indispensable. Nous savons aujourd'hui que les NTC sont capables de conduire à des effets dangereux sur les cellules, les tissus (Van der Zande et al., 2011; Zhao and R. Liu, 2012) ainsi que sur d'autres organismes vivants incluant l'homme (M. Bottini et al., 2006; Monteiro-Riviere et al., 2005), les mammifères (Mitchell et al., 2007; Poland et al., 2008), les plantes (K. Patlolla, 2013) mais également, les organismes aquatiques (Krysanov et al., 2010). Les connaissances sur le devenir des NTC dans l'environnement et leur interaction avec les organismes vivants restent cependant très limitées.

Une étude préliminaire réalisée au sein de notre laboratoire a permis de mettre en évidence des effets de toxicités aigüe (mortalité) sur les larves de *X. laevis* en présence de fortes concentrations de NTCMW bruts. Pour les plus faibles doses, des effets de toxicité chronique (inhibition de croissance, génotoxicité) ont pu être observées sous certaines conditions expérimentales et plus particulièrement lorsque les NTCMW étaient dispersés par des

tensioactifs tels que la gomme arabique, à une concentration de 1 mg/L (Bourdiol et al., 2013).

Parallèlement à ces résultats, des observations macroscopiques ont permis de mettre en évidence une forte présence de nanotubes dans les branchies et dans l'intestin des larves de xénope étudiées. Des travaux réalisés en microscopie électronique à balayage couplée à de la spectroscopie RAMAN n'ont pas permis à ce jour de montrer une pénétration de ces tubes dans les tissus (Bourdiol, 2013). Un effet indirect des NTC sur les organismes a donc été suspecté.

L'objectif de ce travail a donc été de comprendre les mécanismes moléculaires à l'origine des effets chroniques observés et plus particulièrement des effets génétiques. Les travaux présentés dans ce chapitre se concentreront sur l'évaluation des mécanismes de toxicité des NTCMW sur des larves d'amphibien, à l'origine des effets indirects observés.

Deux scénarios d'exposition ont été étudiés, par le biais de l'exposition des larves à des suspensions de NTCMW bruts, s'agglomérant et sédimentant rapidement, ou de NTCMW dispersés à l'aide de matière organique (MO) naturelle provenant de la « Suwannee river », en vue de leur dispersion et de leur stabilisation au sein de la colonne d'eau. Précisons que le choix de l'agent dispersant utilisé n'est pas anodin, puisque la MO «Suwannee river» est largement utilisée depuis quelques années pour la dispersion des NTC (Alpatova et al., 2010; Hyung et al., 2007; Schwyzer et al., 2013)

Dans le cadre d'une démarche prospective menée au laboratoire, la toxicité aiguë des NTCMW a été évaluée sur les larves de *X. laevis* après leur exposition pendant 24, 48, 72 ou 96 h à des concentrations allant de 1 à 500 mg/L de NTCMW bruts. Dans le but de mettre en évidence l'implication des NTCMW dans l'induction potentielle d'un stress oxydant, différents paramètres ont été mesurés. La production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) par les larves de xénope a été évaluée grâce au dosage du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), un

des marqueurs de la perturbation du statut redox des cellules. Afin de compléter ces résultats, une mesure des activités enzymatiques de réponse à une production d'ERO a été réalisée. Dans le cadre de cette thèse nous nous sommes focalisés sur les trois enzymes clefs du système antioxydant : la catalase (CAT), la glutathion réductase (GR) et les superoxydes dismutases (SOD). Les mesures de la production du peroxyde d'hydrogène et d'induction des activités enzymatiques ont été réalisées après exposition des larves à trois concentrations de NTCMW bruts (0,1 ; 1 et 10 mg/L) ou dispersés (0,1 mg/L) pendant une durée de 2, 4, 8, 12 et 24 h.

L'implication potentielle de la peroxydation des lipides en réponse à une exposition à différentes concentrations de NTCMW bruts (0,1 ; 1 et 10 mg/L) a été étudiée par le biais du dosage du malondialdéhyde (MDA), un marqueur issu de l'action des dérivés réactifs de l'oxygène sur les acides gras polyinsaturés au cours du stress oxydant. Les dosages ont été réalisés après 2, 4, 8, 12 ou 24 h d'exposition aux NTCMW bruts.

Une étude des effets génétiques des NTCMW sur les érythrocytes de larves de xénope a également été mise au point grâce au test des Comètes. Deux paramètres (Tail DNA et Tail Length) ont été pris en considération dans la mesure des dommages à l'ADN après exposition des larves à des concentrations de 0,1 ; 1 et 10 mg/L de NTCMW bruts.

II. Production et caractérisation des NTCMW

Les NTCMWs utilisés pour nos expériences sont produits à l'échelle pré-industrielle par la société ARKEMA. Ils sont commercialisés sous le nom de GRAPHISTRENGTH C100. Ces nanotubes sont synthétisés par dépôt chimique catalytique en phase vapeur (CCVD : Catalytic Chemical Vapor Deposition) dans un lit fluidisé (réacteur vertical) sur un support catalytique constitué d'oxyde d'aluminium (Al_2O_3 , $\leq 7\%$, [1344-28-1]), d'oxyde de fer (Fe_2O_3 , $\leq 5\%$, [1309-37-1]) et de molybdène (735 ppm). La source de carbone utilisée est l'éthylène (C_2H_4).

Les suspensions initiales de NTCMW ont été fournies par la société ARKEMA dans 20 ml d'eau désionisée, à des concentrations finales de 0,1 ; 1 et 10 mg/L. Les observations par microscopie électronique à transmission (MET) et les caractéristiques physiques de NTCMW bruts sont représentées respectivement dans la **figure III.1** et le **tableau III.1**.

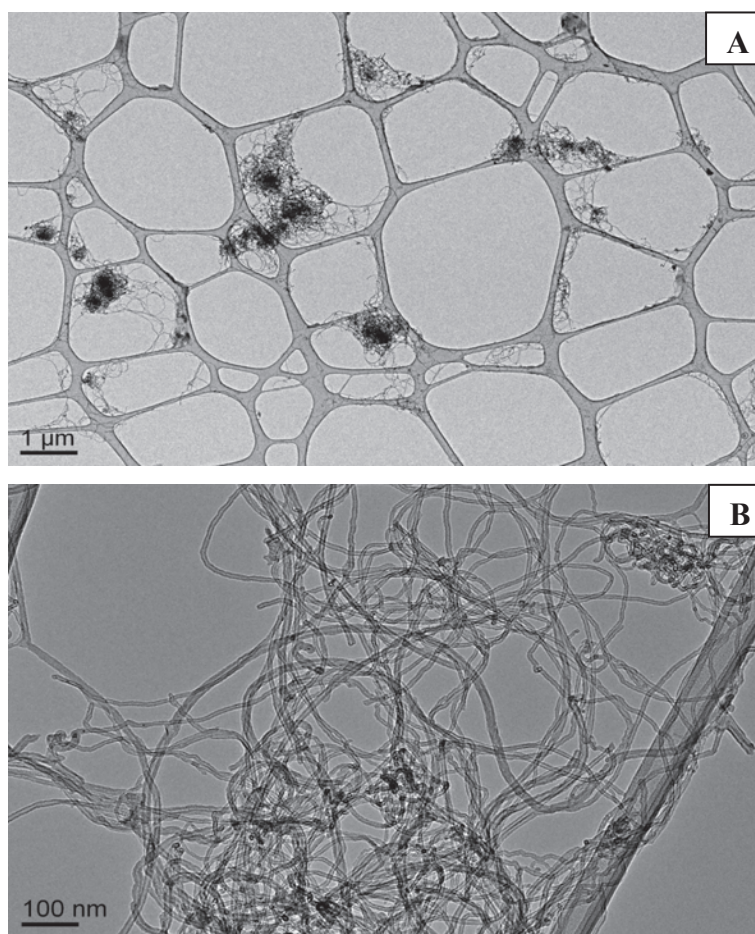


Figure III.1 : Observation en MET d'échantillons de NTCMW bruts à faible (A) et à fort (B) grossissement (Bourdiol et al., 2013).

L'analyse élémentaire des NTCMW fournis indique une teneur massique en carbone d'environ 90%. Cette teneur a été déterminée par combustion éclair (Laboratoire de chimie de coordination, CNRS, Toulouse). L'échantillon est introduit dans un four préchauffé à 925 °C,

puis chauffé à 1800 °C durant approximativement une seconde, avant d’être analysé (Perkin Elmer 2400 série II CHNS/O Elemental Analyser System).

La surface spécifique des NTC a été calculée à partir de la quantité d’azote (N₂) adsorbé par l’échantillon et mesurée au cours d’une désorption brusque. Les résultats ont été interprétés selon la théorie de Brunauer, Emmett et Teller qui repose sur la détermination de la surface réelle (accessible au gaz) des grains de poudre à partir de la surface recouverte par chaque molécule de N₂ et du nombre de molécules qui correspond au recouvrement initial de chaque grain (*i.e.* formation d’une monocouche ou couche mono-moléculaire).

La surface spécifique a été mesurée après dégazage de l’échantillon pendant 4 h à 120°C dans du N₂ et l’adsorption de l’azote gazeux à la température de l’azote liquide (Flux Micrométrique Sorb II 2300; précision de mesure ≈ 3%).

Selon le fournisseur, les NTCMW ont entre 5 et 15 parois, leur longueur varie de 0,1 à 10 µm et la taille moyenne des agglomérats se situe entre 200 et 500 µm (Granulométrie à diffraction laser, d (v ; 0,5)).

Tableau II.1 : Caractérisation des nanotubes de carbone multi-parois Graphistrength®.

Synthèse	CCVD
Catalyseurs	Fe/Mo-Al ₂ O ₃
Pureté (wt %)	> 90
Aspect	Poudre noir solide
Solubilité	Non soluble in water and organic solvent
Nombre de Parois	5 – 15 (100 % MWNT)
Diamètre	10 – 15 nm
Taille	0.1 – 10 µm
Surface spécifique	210 – 260 m ² /g

III. Évaluation des mécanismes de toxicité des NTCMW

III.1. protocoles

III.1.1. Evaluation de la toxicité aiguë des NTCMW

La toxicité aiguë des NTCMW a été évaluée sur des larves de xénope, exposées à des concentrations de 0,1 ; 1, 10, 50, 100 et 500 mg/L pendant 24, 48, 72 et 96 h. La mortalité, le retard de croissance et la diminution d'alimentation ont été évalués selon les recommandations ISO (Mouchet et al., 2008).

III.1.2. Mesure des paramètres du stress oxydant

L'évaluation d'une potentielle induction d'un stress oxydant a été réalisée sur des larves de *X. laevis*, exposées à des concentrations de 0,1 ; 1 et 10 mg/L de NTCMW bruts ou dispersés. Notre choix s'est porté sur deux paramètres importants, à savoir, la production d'ERO et l'induction d'enzymes anti-oxydatives. En ce qui concerne les ERO, notre choix s'est porté sur l' H_2O_2 , un des produits principaux synthétisé au cours du stress oxydant. L'évaluation de ce stress a également été réalisée par la mesure de trois enzymes clefs, impliquées dans la réponse à un déséquilibre de la balance redox à savoir, la glutathione réductase (GR), la catalase et la superoxyde dismutase (SOD).

III.1.2.1. Mesure de la concentration du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)

Le dosage du peroxyde d'hydrogène a été réalisé sur 5 lots de 10 larves (n=5) exposées à trois concentrations de NTCMW (0,1 ; 1 ou 10 mg/L) pendant 2, 4, 8, 12 ou 24 h. Avant chaque dosage, les larves sont préalablement broyées à l'aide d'un homogénéisateur (Heidolph, RZR 2021) dans 1 mL d'acide trichloracétique (TCA) à 0,1% (W/V) puis centrifugées à 12.000 rpm pendant 20 min. Le dosage du H_2O_2 a été réalisé dans un mélange

réactionnel contenant 250 μL du surnageant, 250 μL de tampon phosphate- potassium à 10 mM (pH 7,0) et de 500 μL d'iodure de potassium 1M.

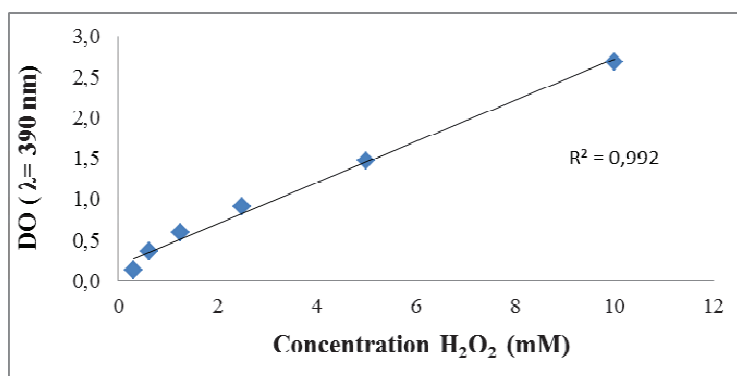


Figure III.2 : Courbe étalon H_2O_2 .

La mesure de l'absorbance a été réalisée à 390 nm et la composition en H_2O_2 de l'échantillon est déterminée à l'aide d'une courbe étalon réalisée dans les mêmes conditions expérimentales que les échantillons en remplaçant les 250 μL de surnageant par de l' H_2O_2 à 3% (Hydrogen peroxide solution, 323381, Sigma, France). La courbe étalon comprend une gamme de concentration allant de 0,31 à 10 mM d' H_2O_2 (**figure III.2**). La concentration en H_2O_2 de l'échantillon est donnée en milli mole par mg (mmole/mg) de poids frais.

III.1.2.2. Mesure des activités enzymatiques impliquées dans la réponse au stress oxydant

Dans le but de mesurer les activités enzymatiques liées au stress oxydant, une étape d'extraction et de dosage de protéines totales solubles a été réalisée. Pour ce faire, cinq groupes de 10 larves ont été broyées dans 1 mL d'une solution contenant 975 μL de tampon phosphate Na/K à 100 mM (pH 7), 11,5 μL de KCl, 2,5 μL de cocktail inhibiteur de protéase, 10 μL de PMSF et 1 μL d'aprotinine. Il est très important que l'étape du broyage se déroule à 4°C afin d'éviter la dégradation des protéines. L'homogénat est ensuite centrifugé à 13.000

rpm pendant 19 min à 4°C. Le surnageant obtenu est utilisé pour le dosage des protéines totales solubles mais aussi pour la mesure des activités enzymatiques, GR, CAT et SOD.

III.1.2.2.1. Mesure des protéines totales solubles

Le contenu en protéines des larves est déterminé selon la méthode de Bradford (Bradford, 1976) en utilisant un spectrophotomètre (Helios Alfa, Thermo Electron Corporation, USA). Le dosage des protéines a été réalisé à partir du surnageant issu du broyage des larves (**voir paragraphe III.1.2.2**) grâce à la mesure de la densité optique (DO) à 595 nm. Le mélange réactionnel était composé de 20 µL de surnageant et de 980 µL de solution Bradford (B6916, Sigma, France). Les mesures ont été réalisées après une incubation de 20 min, à température ambiante et à l'abri de la lumière. La teneur en protéines (mg/mL d'échantillon) est déterminée par référence à une gamme étalon allant de 0,125 à 2 mg/mL (**figure III.3**) de BSA (Bovin Serum Albumin, SIGMA France), réalisée dans les mêmes conditions expérimentales que les échantillons.

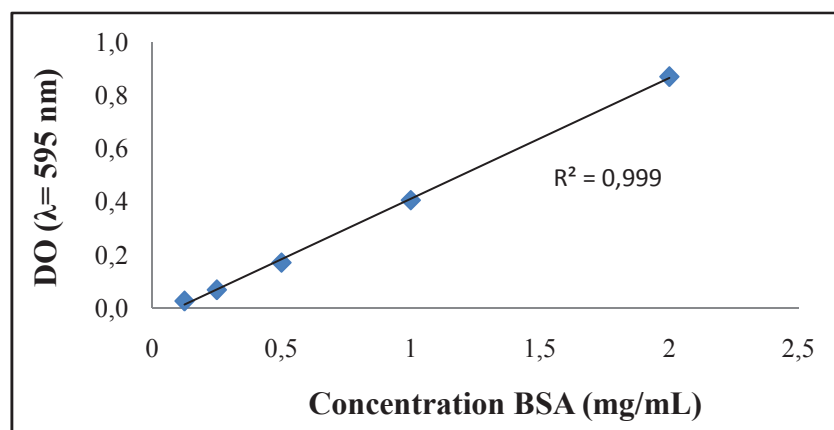


Figure III.3 : Courbe étalon BSA pour le dosage des protéines.

III.1.2.2.2. Mesure des activités enzymatiques

La mesure des activités enzymatiques GR, CAT et SOD, impliquées dans la réponse à un stress oxydant a été réalisée sur les mêmes échantillons utilisés pour le dosage des protéines totales solubles. L'ensemble des mesures a été effectué par des dosages spectro-photométriques.

III.1.2.2.2.1. Glutathion réductase (EC 1.8.1.7)

L'activité GR a été évaluée en utilisant un kit de dosage (Sigma, GRSA-1KT). Le mélange réactionnel était composé de 400 µL de tampon phosphate de potassium 100 mM (pH 7,5 avec 1 mM EDTA), 500 µL de GSSG à une concentration de 1,42 mg/mL, 50 µL de NADPH à 1,85 mg/mL, auxquels ont été rajoutés 50 µL du surnageant pour permettre le démarrage de la réaction enzymatique. Le principe de la mesure est basé sur le changement de densité optique (DO) à 340 nm sur une durée totale de 2 minutes. Ce changement de DO est induit par la réduction du NADPH et du glutathion oxydé (GSSG) en glutathion réduit (GSH) grâce à l'enzyme GR présente dans l'échantillon.

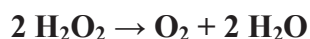


L'activité spécifique de l'enzyme est exprimée en µmoles de NADPH oxydé par minute rapporté à la concentration initiale en protéines totales mesurée dans chaque échantillon (µmole. min⁻¹. mg⁻¹ protéines ou U. mg⁻¹ protéines). L'activité GR a été calculée selon l'équation suivante : **GR (U/mL) = (A blanc – A échantillon) / ε^{mM}** (A : absorbance, ε^{mM} = 6,22). La valeur obtenue est ensuite divisée par la concentration en protéine obtenue pour le même échantillon.

III.1.2.2.2.2. Catalase (EC 1.11.1.6)

L'activité CAT assurant la décomposition de l'H₂O₂ en eau et en oxygène, a été mesurée à l'aide d'un kit (CAT 100-1KT, Sigma, France). Le dosage a été réalisé dans une solution

contenant 500 μL de peroxyde d'hydrogène à 20 mM, 450 μL de tampon phosphate de potassium à 500 mM (pH 7,0) et 50 μL de surnageant.



La décomposition de l' H_2O_2 est suivie à 240 nm pendant 30 secondes par une diminution de l'absorbance. L'activité de l'enzyme est exprimée en μmole d' H_2O_2 dégradé par minute et par milligramme de protéines. Elle est déterminée grâce à l'équation suivante :

$\text{CAT (U/mL)} = (A \text{ blanc} - A \text{ échantillon}) / \epsilon^{\text{mM}}$ (ou $\epsilon^{\text{mM}} = 0,0436$). La valeur obtenue a ensuite été divisée par la concentration en protéine obtenue pour chaque échantillon.

III.1.2.2.2.3. Superoxyde dismutase (EC 1.15.1.1)

Comme pour les autres activités enzymatiques, la SOD a été mesurée grâce à l'utilisation d'un Kit (19160, Sigma, France). Le dosage a été réalisé selon une micro-méthode dans un mélange réactionnel contenant 20 μL de surnageant, 200 μL de solution WST-1 et 20 μL d'enzyme. Le principe de cette mesure est basé sur la réduction du WST-1 en formazan suite à la transformation de l' O_2 en anion superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Le taux de réduction de WST-1 est proportionnel à l'activité xanthine oxydase (XO), enzyme inhibée par la présence de la SOD (**figure III.4**).

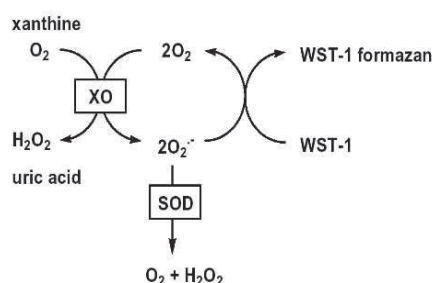


Figure III.4 : Principe de dosage de la SOD (<http://www.sigmaaldrich.com>)

L'inhibition de la xanthine oxydase par la SOD est suivie par une diminution de la densité optique à 450 nm après un temps d'incubation de 20 minutes à 37°C. L'activité SOD est déterminée à l'aide d'une courbe étalon représentant le pourcentage d'inhibition de la xanthine oxydase en fonction de la concentration en SOD. La courbe étalon est réalisée dans les mêmes conditions expérimentales que les échantillons. Au final l'activité SOD est exprimée en $\mu\text{mole d'O}_2^-$ dégradé par minute et par milligramme de protéines.

III.1.3. Mesure de la peroxydation des lipides

La peroxydation des lipides est évaluée grâce au dosage du malondialdéhyde (MDA), l'un des sous-produits les plus répandus de la peroxydation lipidique au cours du stress oxydant (Lefèvre et al., 1998).

La concentration du MDA dans les larves entières a été mesurée par le dosage de l'acide thio-barbiturique (TBA) selon la méthode d'Ohkawa *et al.* (H Ohkawa, 1979). La mesure du MDA a été réalisée sur les mêmes échantillons utilisés pour le dosage des activités enzymatiques. Le mélange réactionnel était composé de 50 μL de surnageant (**voir paragraphe III.1.2.2**), 750 μL d'acide acétique à 20% (pH 3,5), 100 μL de SDS à 8,1%, 350 μL d'eau distillée et de 750 μL de TBA à 0,8 % pour le déclenchement de la réaction. Le mélange réactionnel est ensuite incubé à 95°C pendant 1 h. A l'issu de cette étape, la réaction est stoppée par l'ajout de 2,5 mL de butanol-1. Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 2500 rpm pendant 10 minutes à 4°C. L'absorbance de la phase organique (partie supérieure) a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 532 nm.

La concentration en MDA a été déterminée grâce à l'utilisation d'une courbe étalon réalisée à partir d'une solution standard de MDA allant de 1 à 40 μM , dans les mêmes conditions expérimentales que les échantillons (**figure III.5**).

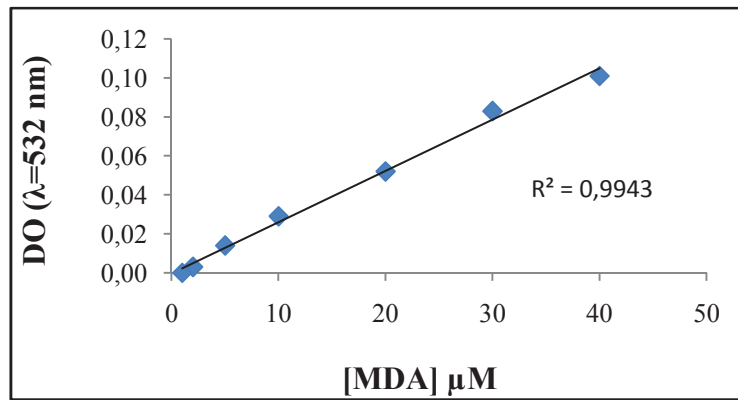


Figure III.5 : Courbe étalon du malondialdéhyde (MDA)

III.1.4. Mesure des dommages à l'ADN par le test des Comètes

Le test des comètes ou *Single Cell Gel Electrophoresis* (SCGE) est une technique d'électrophorèse sur micro-gel d'agarose. Il permet de mesurer les cassures induites directement par un agent génotoxique et indirectement lors des processus enzymatiques de réparation des dommages ou lors de processus secondaires de fragmentation de l'ADN tel que l'apoptose. Les essais Comètes réalisés dans le cadre de ce travail sont basés sur le protocole de Singh *et al.*, (Singh *et al.*, 1988) avec une adaptation aux larves de *X. laevis* (Mouchet *et al.*, 2005).

Chaque groupe de larves (n=5) est exposé pendant 2, 4, 8 et 24 h à des concentrations de 0,1 ; 1 et 10 mg/L de NTCMW bruts. A la fin de l'exposition, chaque larve est anesthésiée par immersion dans une solution de tricaine méthane sulfonate (MS222, Sandoz). Un prélèvement de sang est ensuite réalisé par ponction intracardiaque de chaque larve, sous loupe binoculaire. Dès l'obtention de l'échantillon sanguin, les opérations suivantes sont successivement réalisées :

- **Isolement des érythrocytes en gel d'agarose**

La veille de l'expérience, une opération de trempage des lames dans un gel liquéfié d'agarose frais normal à 0,8 % (dissous dans du PBS 1X) est effectuée, constituant ainsi la première couche d'amorce. 65 μ L d'un second gel d'agarose liquéfié (préparé ex tempore) à bas point de fusion (dilué à 1% dans du PBS) sont mélangés à un volume équivalent de cellules en solution PBS et sont déposés sur la première couche. Une lamelle est immédiatement déposée sur cette seconde couche afin d'étendre uniformément le gel. Après 5 minutes de solidification de l'agarose sur un lit de glace, la lamelle est retirée avec précaution. Le dépôt final de 90 μ L de gel d'agarose liquéfié à 1% permet de prendre en sandwich la suspension cellulaire et d'éviter sa dessiccation. Après 5 minutes de solidification sur lit de glace, les lames dont la lamelle est ôtée, sont prêtes pour subir les étapes suivantes. Ces dernières se déroulent en chambre noire sous lumière inactinique de façon à limiter les dommages à l'ADN artéfactuels induits par les UV de la lumière naturelle.

- **Lyse des érythrocytes**

Les lames sont recouvertes pendant 1 h d'une solution de lyse composée de sels à forte concentration et de détergent (NaCl à 2,5 M, Na₂EDTA à 0,1 M et de Trizma® base à 0,01 M), amenée à pH 10 par addition de NaOH, à laquelle sont ajoutés extemporanément 1% de Triton X-100 et 10 % de DMSO. Cette lyse forte élimine d'une part les membranes plasmiques et nucléaires par action du Na₂ EDTA qui déstabilise les membranes en chélatant les ions bivalents ; d'autre part, elle débarrasse la cellule de tout le matériel extranucléaire sans altérer les acides nucléiques.

- **Déroutement de l'ADN et électrophorèse**

Les lames sont transférées dans une cuve d'électrophorèse, recouvertes d'une solution tampon électrophorétique à pH supérieur à 13, composée de NaOH 5N et de Na₂ EDTA à 0,2 M. 20 minutes suffisent à dérouler l'ADN et à séparer les deux brins par rupture des liaisons hydrogène sous l'action de la soude. L'électrophorèse, dans ce même tampon, à 20 V et 300 mA, dure 20 minutes pour les cellules issues des larves de Xénope (Mouchet, 2002). Cette électrophorèse provoque la migration de l'ADN, chargé négativement, de la cathode vers l'anode formant ainsi une comète quand l'ADN nucléaire présente des cassures.

- **Neutralisation**

Les lames sont rincées deux fois, durant 5 minutes, par une solution de neutralisation composée de Trizma® Base à 0,4 M amenée à pH 7,5 par de l'acide chlorhydrique concentré. Ainsi, l'excès de détergent et d'alcalinité est éliminé (Tice et al., 1991). Le pH neutre favorise le ré-appariement des brins d'ADN de l'étape suivante.

- **Marquage et observation des lames**

Le bromure d'éthidium (BET), marqueur de fluorescence choisi pour notre étude, s'intercale entre les paires de bases des acides nucléiques. Le traitement alcalin précédent dégradant l'ARN (Singh et al., 1988), seules les paires de base ré-appariées de l'ADN sont marquées. Après dépôt de 50 µL de BET, une lamelle est déposée sur chacune des préparations prêtes à l'observation.

- **Observation**

3 types d'ADN peuvent être différenciés :

- ceux qui apparaissent sous la forme d'une sphère fluorescente bien circonscrite (**figure III.6.A**) correspondant à un noyau exempt de dommages à l'ADN (ADN contrôle négatif),
- ceux qui se présentent sous la forme d'une comète formée d'une tête et d'une queue (**figure III.6.B**) résultant de la migration différentielle de l'ADN d'autant plus importante que sa fragmentation augmente,
- ceux dont la tête est physiquement bien séparée de la queue, qualifiés d'ADN apoptotique et/ou nécrotique (**figure III.6.C**) non pris en compte dans notre étude.

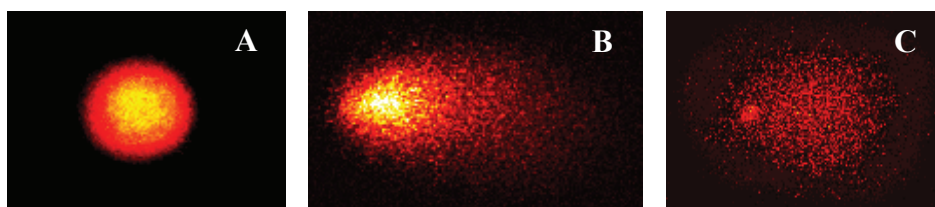


Figure III.6 : les trois types d'ADN observés par le test des Comètes.

Cinquante images par lame lues en microscopie à fluorescence (Zeiss LSM 410, Rhodamine 543 laser He/Ne : objectif 40, filtre d'excitation 510 – 550 nm et filtre de barrière 590 nm) sont alors capturées aléatoirement (caméra intégrée au Zeiss LSM 410) et à une épaisseur constante du gel.

Evaluation quantitative des comètes

L'évaluation quantitative des comètes est réalisée en temps réel à partir des images capturées à l'aide du logiciel spécialisé Komet® 5.5 (Andor Technology®). Ce logiciel calcule le profil d'intensité $C(x)$ intégré pour chaque ADN vu comme une matrice $I(x, y)$ (**figure III.7**) et établit une discrimination entre la tête et la queue de la comète. 34 paramètres sont estimés à partir de ce profil :

- 9 paramètres de la comète calculés sur $C(x)$,

- 9 paramètres de la tête calculés sur $T(x)$,
- 9 paramètres de la queue calculés sur $Q(x)$
- et 7 paramètres, qualifiés de globaux (calculés à partir des 3 types de paramètres précédents).

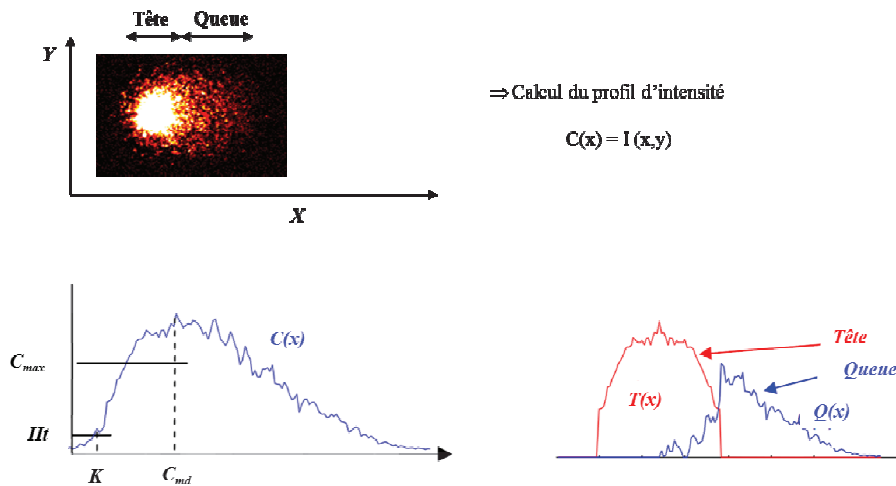


Figure III.7 : calcul du profil d'intensité de la comète à partir de l'image vue comme une matrice $I(x, y)$ et discrimination entre la tête et la queue.

H_t : seuil de niveau d'intensité marquant le début de la tête de la comète (10% du niveau maximal ont été sélectionnés au niveau du logiciel)

k : position correspondante à H_t – C_{max} : valeur maximale d'intensité de la comète – C_{md} : position correspondant à la valeur maximale d'intensité de la comète – a : longueur maximale de la comète.

- Les 9 paramètres (calculés sur $C(x)$, $T(x)$ et $Q(x)$) sont liés aux caractéristiques statistiques de l'image de la comète. Ils sont calculés selon le mode (position du maximum d'intensité, C_{md}), la moyenne (centre de gravité), la déviation standard (écart-type), l'étendue (dynamique), le moment distribué (moyenne – k), l'inertie

(variance + (moyenne – k)), la symétrie (coefficient d'asymétrie), le coefficient de variation (déviation standard/moyenne) x100) et l'intensité optique (somme du profil $C(x)$, $H(x)$, $T(x)$).

- Les 7 paramètres « globaux » de la comète sont déterminés à partir des 9 paramètres précédents (calculés sur $C(x)$, $T(x)$ et $Q(x)$) et concernent dans le cadre de cette étude :
 - le pourcentage d'ADN dans la tête (Tail DNA): pourcentage d'intensité optique de la tête par rapport à celle de la comète
 - la longueur de la queue (TL, Tail length) représentée par son étendue.

III.2. Analyses statistiques des données

L'ensemble des données obtenues sont présentées par la moyenne \pm écart-type. Les comparaisons entre deux groupes ont été réalisées grâce au test de Student (t -test). La normalité et l'homogénéité des variances sont respectivement vérifiées en utilisant les tests Shapiro-Wilk et le F test. La transformation des données est utilisée afin de corriger (si nécessaire) la déviation de la normalité ainsi que dans le but de stabiliser la variance.

Nous avons considéré les transformés les plus puissants comme les meilleurs candidats sur la base de la procédure de transformation Box-Cox. Le niveau de significativité choisi était de 5% ($p < 0,05$). Les calculs statistiques ont été réalisés par le logiciel R® (R Development core Team, 2012)

III.3. Résultats

III.3.1. Evaluation de la toxicité aigüe des NTCMW

Les résultats de mortalité après 24, 48, 72 et 96 h d'exposition des larves de *X. laevis* à différentes concentrations de NTCMW bruts sont représentés sur la **Figure III.8**. Les données mettent en évidence une absence de mortalité quelle que soit la concentration et le temps

d'exposition. Cependant, une mortalité dose-dépendante est observée à 96 h à partir d'une concentration de 50 mg/L de NTCMW (non significative). Le pourcentage de mortalité devient significatif à partir de 100 mg/L.

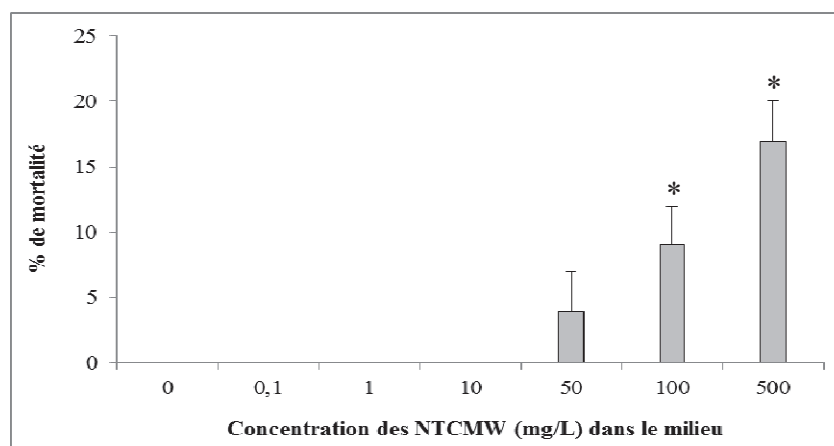


Figure III.8 : Résultat de toxicité aiguë (mortalité) chez les larves de *Xénope* après 96 h d'exposition statique aux NTCMW bruts. Les données sont représentées en pourcentage de mortalité moyenne chez les larves.

III.3.2. Effet des NTCMW sur l'induction du stress oxydant

L'induction d'un stress oxydatif suite à une exposition à des NTCMW a été évaluée par la mesure de paramètres importants, connus pour leur implication dans le statut rédox cellulaire. Dans un premier temps nous avons analysé la cinétique de production d' H_2O_2 en présence de trois concentrations de nanotubes (0,1 ; 1 et 10 mg/L) pendant une durée de 2, 4, 8, 12 et 24 h. Dans ces mêmes conditions et dans un deuxième temps, le dosage de l'activité de trois enzymes impliquées dans la lutte contre le stress oxydant (GR, CAT et SOD) a été réalisé.

III.3.2.1. Induction d'ERO par des larves exposées au NTCMW

Les résultats de dosage du peroxyde d'hydrogène sur des larves entières en présence ou en absence (contrôle négatif) de NTCMW bruts dans le milieu d'exposition sont représentés dans le **tableau III.2**.

Tableau III.2 : Concentration de peroxyde d'hydrogène (mM/mg de poids frais) chez des larves de *Xenopus laevis* exposées pendant 2, 4, 8, 12 et 24 h à différentes concentrations de NTCMW (0,1, 1 et 10 mg/L). Les valeurs représentent la moyenne de la concentration d'H₂O₂ en mmole par milligramme de poids frais \pm écart-type (n=5).

Les concentrations de la même ligne représentées par des lettres différentes sont significativement différentes (Saria et al, 2014).

Temps	CTRL	MW 0.1	MW 1	MW 10
2	1,2 \pm 0,3 ^a	1,9 \pm 0,2 ^a	1,3 \pm 0,3 ^a	2,6 \pm 0,5 ^b
4	1,1 \pm 0,1 ^a	0,9 \pm 0,1 ^a	3,0 \pm 0,3 ^b	1,3 \pm 0,1 ^c
8	2,2 \pm 0,2 ^a	2,0 \pm 0,1 ^a	2,9 \pm 0,1 ^b	2,1 \pm 0,4 ^a
12	1,9 \pm 0,1 ^a	1,7 \pm 0,1 ^a	3,2 \pm 0,2 ^b	2,2 \pm 0,1 ^c
24	1,3 \pm 0,1 ^a	1,4 \pm 0,1 ^a	1,7 \pm 0,1 ^b	1,3 \pm 0,1 ^a

On peut observer que les larves exposées à une concentration de 0,1 mg/L de NTCMW ne montrent aucune production significative d'H₂O₂, quel que soit le temps d'exposition. Le taux de production reste en effet constant, de façon identique à celui du contrôle négatif.

En présence d'une concentration de 1 mg/L de NTCMW, une forte production de peroxyde d'hydrogène est observée à partir de 4 h d'exposition ($p < 0,05$). Cette production atteint en

effet une valeur maximale de $3,0 \pm 0,3$ mmole/mg de poids frais. Au même moment, la production d' H_2O_2 était de seulement $1,1 \pm 0,1$ mmole/mg de poids frais chez les larves témoins. La concentration d' H_2O_2 produite est restée ensuite constante jusqu'à 12 h puis a diminué à une valeur de $1,7 \pm 0,1$ mmole/mg de poids frais après 24 h d'exposition ($p < 0,05$).

À 10 mg/L de NTCMW bruts, la production d' H_2O_2 était de $2,6 \pm 0,5$ mmole/mg de poids frais après seulement 2 h d'exposition contre une concentration de $1,2 \pm 0,3$ mmole/mg de poids frais observée chez les larves témoins. La production d' H_2O_2 diminue ensuite jusqu'à 8 h puis augmente à nouveau jusqu'à une valeur de $2,2 \pm 0,1$ mmole/mg de poids frais après 12 h d'exposition ($p < 0,05$). Après 24 h, le taux d' H_2O_2 diminue significativement pour atteindre des valeurs similaires à celles du témoin négatif ($1,3 \pm 0,1$ mmole/mg de poids frais).

III.3.2.2. Induction des enzymes du stress oxydant en présence de NTCMW

Les résultats de l'analyse des activités enzymatiques GR, CAT et SOD, mesurées chez des larves exposées à trois concentrations de NTCMW bruts (0,1 ; 1 ou 10 mg/L) pendant 2, 4, 8, 12 et 24 h sont représentés sur la **figure III.9**. Nous pouvons observer que pour des larves placées dans les cristallisoirs contenant 0,1 mg/L de NTCMW, l'induction de l'activité GR (**figure III.9.A**) est significative à partir de 8 h et atteint une valeur de $84,3 \pm 2,3$ $\mu\text{U}/\text{mg}$ de protéines. L'activité GR diminue ensuite progressivement à une valeur de $38,3 \pm 1,6$ $\mu\text{U}/\text{mg}$ de protéines à 24 h. Dans ces conditions d'exposition, la CAT et la SOD ne sont pas induites.

Pour les larves exposées à une concentration de 1 mg/L de NTCMW, les activités GR et CAT (**figure III.9.A et III.9.B**) sont significativement induites à partir de 4 h d'exposition. Elles atteignent respectivement des valeurs de $123,3 \pm 16,8$ $\mu\text{U}/\text{mg}$ de protéines et de $257,2 \pm 27,1$ mU/mg de protéines. Après 24 h, ces deux activités diminuent progressivement à des concentrations de $39,7 \pm 1,7$ $\mu\text{U}/\text{mg}$ de protéines et de $73,2 \pm 5,5$ mU/mg de protéines, respectivement.

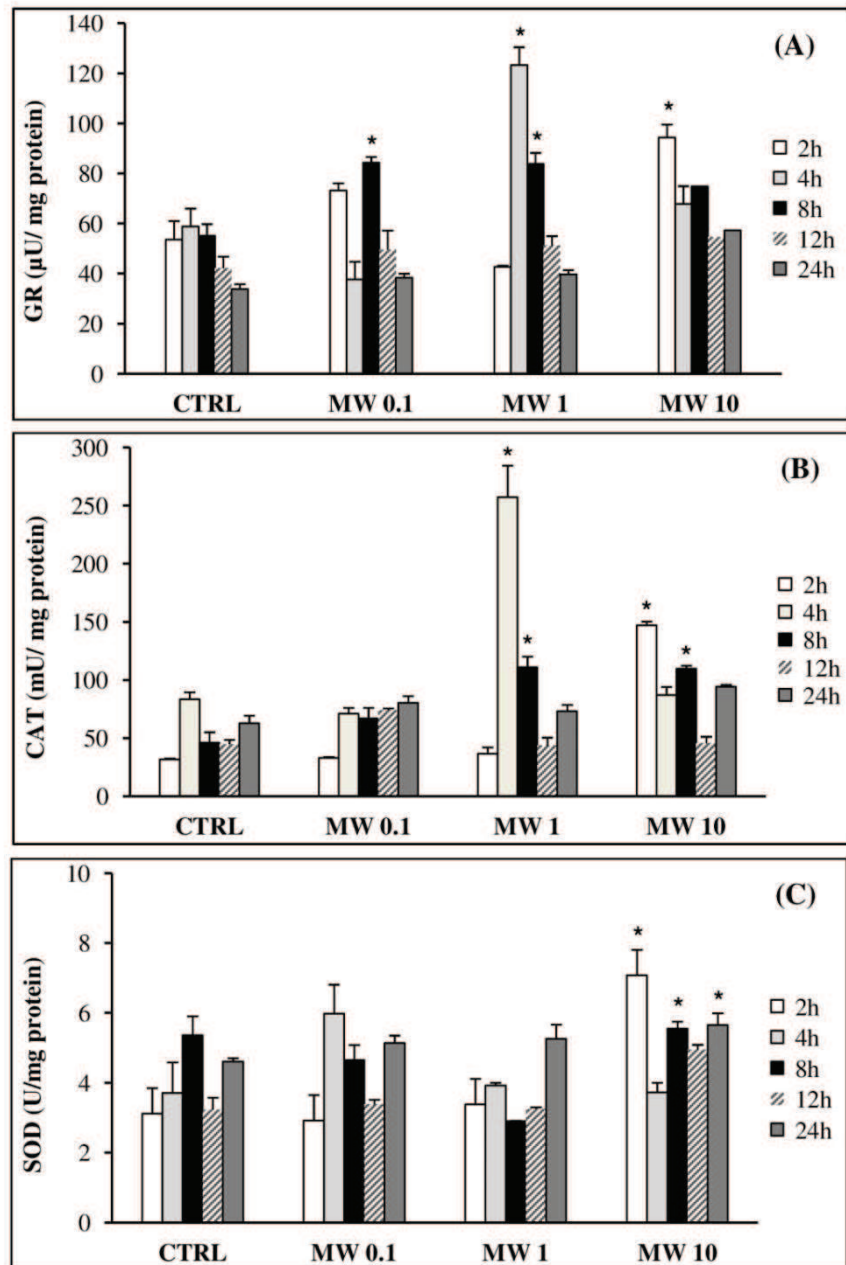


Figure III.9 : Induction d'activités enzymatiques du stress oxydant (GR, CAT, SOD) après exposition des larves de *X. laevis* à différentes concentrations de NTCMW bruts (0,1 ; 1 et 10 mg/L) pendant 2, 4, 8, 12 et 24 h. (A) activité glutathione réductase (GR), (B) activité catalase (CAT), (C) activité superoxyde dismutase (SOD). Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart-type. *: indique une induction significative ($p < 0.05$) des activités enzymatiques en comparaison avec le control négatif (CTRL).

Lorsque les larves sont exposées à une concentration de 10 mg/L de NTCMW, toutes les activités enzymatiques mesurées (GR, CAT et SOD) sont significativement induites à partir de seulement 2 h. Les activités enzymatiques atteignent en effet des valeurs de $94,3 \pm 5,3$ μ U/mg de protéines pour la GR, de $147,1 \pm 3,3$ mU/mg de protéines pour la CAT et de $7,1 \pm 0,7$ U/mg de protéines pour la SOD. Les contrôles négatifs sont quant à eux de $53,6 \pm 7,5$ μ U/mg de protéines, $31,7 \pm 0,9$ mU/mg de protéines et $3,1 \pm 0,3$ U/mg de protéines pour les activités GR, CAT et SOD, respectivement. Une légère diminution de l'activité GR est ensuite observée à 24 h. Pour les activités CAT et SOD, les mêmes fluctuations sont observées dans le temps avec une induction significative à 8 h ($109,9 \pm 2,6$ mU/mg de protéines et $5,5 \pm 0,2$ U/mg de protéines, respectivement) et à 24 h (significative uniquement pour la SOD).

III.3.3. Effets de la dispersion des NTCMW sur les paramètres du stress oxydant

III.3.3.1. Impact des NTCMW dispersés sur la production d' H_2O_2

Les résultats du dosage de l' H_2O_2 chez des larves exposées aux NTCMW dispersés à l'aide de la matière organique «Suwannee river» sont représentés sur le **tableau III.3**.

On peut noter chez les larves témoins une oscillation de la concentration en H_2O_2 dans le temps avec une valeur initiale de $1,4 \pm 0,2$ mmole/mg de poids frais, observé après 2 h d'exposition.

Lorsque les larves sont exposées à de la matière organique seule, des valeurs très similaires aux témoins sont obtenus avec le même profil de fluctuation dans le temps.

En présence de NTCMW bruts dans le milieu une très légère augmentation de la concentration en H_2O_2 a été observée à 2 h ($p > 0,05$). Cette dernière diminue ensuite à partir de 4 h pour atteindre des taux très proches de ceux du témoin négatif.

Tableau III.3 : Concentration de peroxyde d'hydrogène (mmole/mg de poids frais) chez des larves de *Xenopus laevis* exposées pendant 2, 4, 8, 12 et 24 h à 0,1 mg/L de NTCMW bruts ou dispersés par la MO. Les valeurs représentent la moyenne de la concentration d'H₂O₂ en mmole par milligramme de poids frais \pm écart-type (n=5).

Les concentrations de la même ligne représentées par les mêmes lettres ne représentent aucune différence significative.

CTRL ER : témoins négatifs exposés dans de l'ER, CTRL MO : témoins négatives exposés dans de l'ER + 0,1 mg/L de matière organique, MW 0,1 : larves exposés à des NTCMW bruts à une concentration de 0,1 mg/L, MW 0,1 + MO : larves exposés à des NTCMW et de la matière organique à une concentration de 0,1 mg/L (v/v).

Temps	CTRL ER	CTRL MO	MW 0,1	MW 0,1 + MO
2 h	1,4 \pm 0,2 ^a	1,3 \pm 0,1 ^a	1,6 \pm 0,03 ^a	1,9 \pm 0,1 ^a
4 h	0,9 \pm 0,04 ^a	0,9 \pm 0,04 ^a	0,9 \pm 0,1 ^a	0,8 \pm 0,01 ^a
8 h	1,9 \pm 0,03 ^a	1,9 \pm 0,02 ^a	2,0 \pm 0,06 ^a	2,0 \pm 0,02 ^a
12 h	1,7 \pm 0,02 ^a	1,6 \pm 0,0 ^a	1,6 \pm 0,02 ^a	1,7 \pm 0,05 ^a
24 h	1,3 \pm 0,0 ^a	1,1 \pm 0,03 ^a	1,3 \pm 0,1 ^a	1,2 \pm 0,1 ^a

La légère augmentation de la concentration en H₂O₂ a également été observée très précocement chez les larves exposées aux NTCMW dispersés par la MO. En effet, une concentration de 1,9 \pm 0,1 mmole/mg de poids frais a été mesurée au bout de seulement 2 h ($P>0,05$) alors que la concentration en H₂O₂ du contrôle négatif était de 1,4 \pm 0,2 mmole/mg de poids frais. Cette concentration oscille ensuite dans le temps et augmente à 8 h pour atteindre 2 \pm 0,02 mmole/mg de poids frais ($P>0,05$) puis re-diminue progressivement à une valeur basale de 1,2 \pm 0,1 mmole/mg de poids frais ($P>0,05$) au bout de 24 h d'exposition.

III.3.3.2. Impact des NTCMW dispersés sur les activités enzymatiques GR, CAT et SOD

Les résultats de mesure des activités enzymatiques réalisées sur des larves de xénope, exposées pendant 2, 4, 8, 12 et 24 h à des NTCMW dispersés par la MO sont présentés dans la **figure III.10**.

On peut observer que pour les larves exposées à de la MO seule, aucune des activités enzymatiques mesurées n'a été significativement induite. En effet, quel que soit le temps d'exposition, les mesures des activités GR, CAT et SOD ne montrent aucune différence significative entre les contrôles négatifs et les animaux exposés à la matière organique seule. Il est toutefois important de noter que des variations de l'ensemble des activités enzymatiques ont été observées dans le temps aussi bien chez les larves témoins que ceux exposés à la matière organique. Ces variations étaient toute fois plus prononcées dans le cas de la GR. En effet, après une induction maximale observée à partir de 2 h d'exposition ($65,3 \pm 4,1$ μ U/mg de protéine), cette activité diminue pour atteindre un niveau basal de $24,8 \pm 3,5$ μ U/mg de protéine à partir de 8 h. L'activité GR augmente ensuite progressivement pour atteindre une concentration de $52,7 \pm 1,8$ μ U/mg de protéine à la fin du temps d'exposition.

En ce qui concerne les larves exposées aux NTCMW bruts, une variation des activités enzymatiques dans le temps a également été constatée avec une induction maximale observée pour la GR à partir de 4 h ($59 \pm 5,1$ μ U/mg de protéine) et pour la CAT à partir de 2 h ($336,6 \pm 119,4$ mU/mg de protéine). Pour l'activité SOD, de légères variations ont été observées dans le temps avec une induction maximale à 12 h ($5,3 \pm 0,1$ U/mg de protéine).

La présence de NTCMW dispersés dans le milieu d'exposition n'a permis d'observer aucune différence significative avec le contrôle négatif et ce, pour toutes les activités enzymatiques mesurées. Seule l'activité GR montre une augmentation importante à 4 et 8 h d'exposition ($64,8 \pm 11,5$ et $60,1 \pm 12,5$ μ U/mg de protéine, respectivement) à la limite de la significativité.

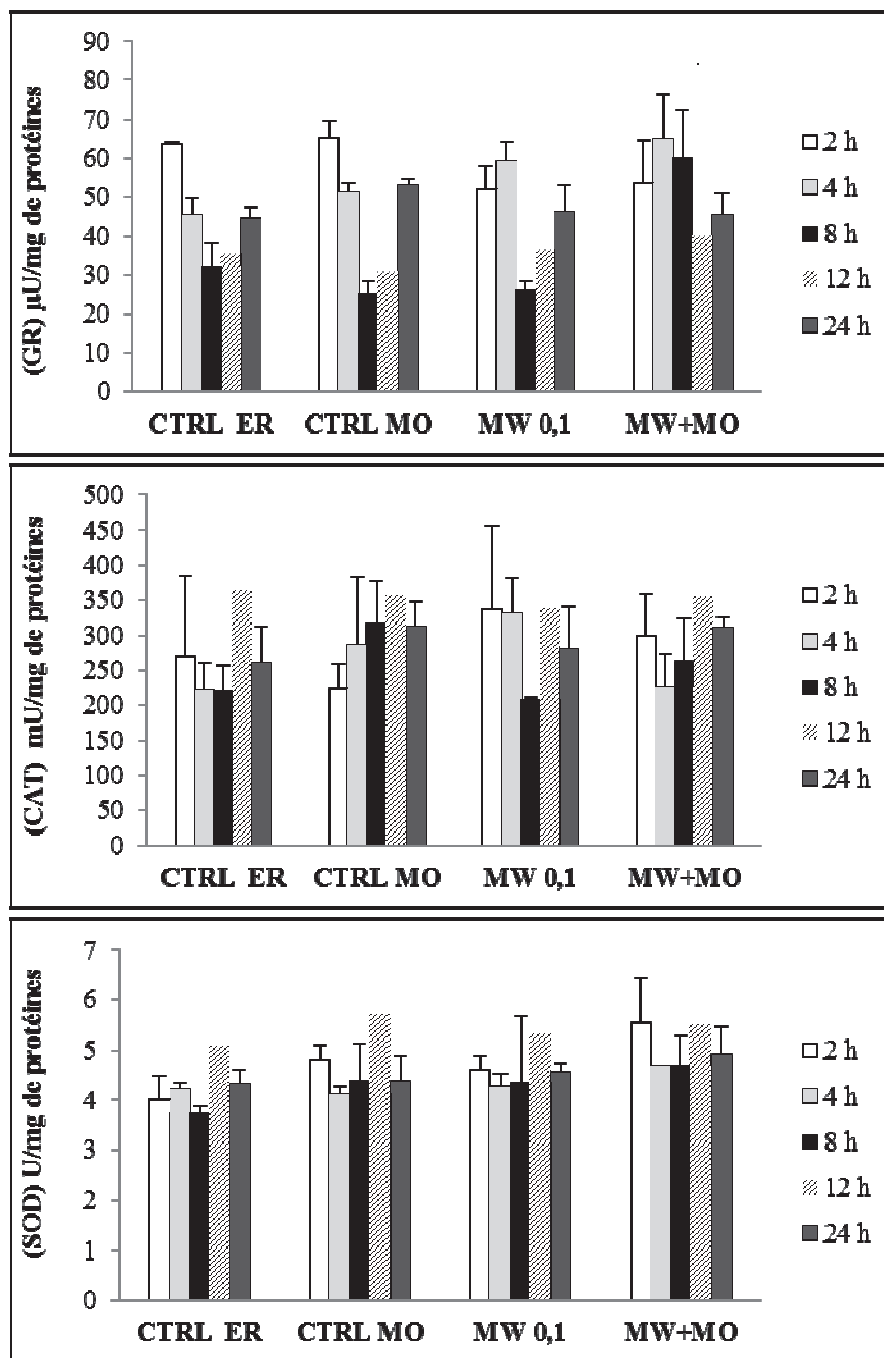


Figure III. 10 : Induction d'activités enzymatiques du stress oxydant (GR, CAT, SOD) après exposition des larves de *X. laevis* à des NTCMW (0,1 mg/L) bruts ou dispersés pendant 2, 4, 8, 12 et 24 h. (A) activité glutathion réductase, (B) activité catalase, (C) activité superoxyde dismutase. Les valeurs représentent les moyennes de 5 réplicats \pm l'écart-type.

CTRL ER : contrôle négatif, CTRL MO : contrôle matière organique, MW 0,1 : NTCMW à 0,1 mg/L, MW+MO : NTCMW à 0,1 mg/L dispersés avec la matière organique.

III.3.4. Effet des NTCMW sur la peroxydation des lipides

Comme nous avons pu le voir précédemment, la peroxydation des lipides a été évaluée par la mesure du malondialdéhyde (MDA), issus de l'action des dérivés réactifs de l'oxygène sur les acides gras polyinsaturés. Les résultats obtenus sont présentés sur la **figure III.11**.

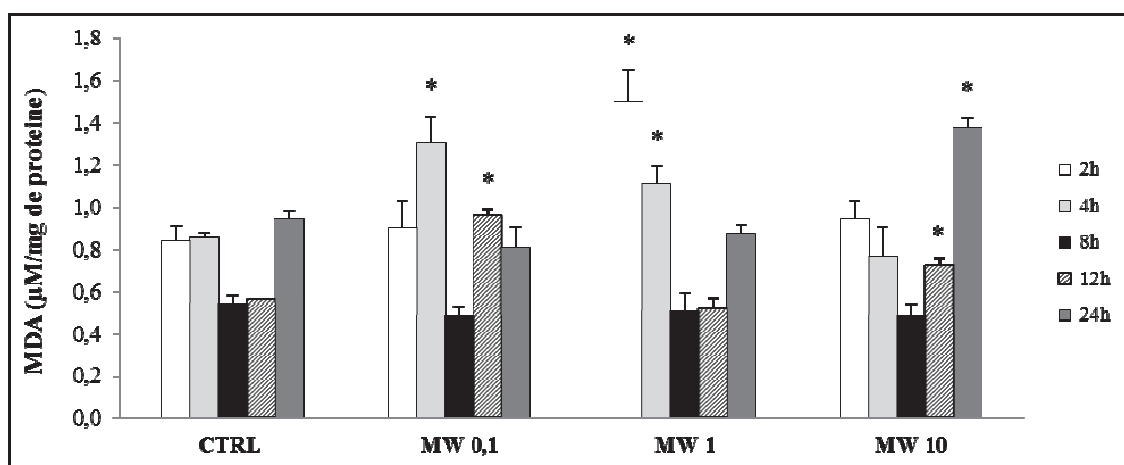


Figure III.11 : Concentration du MDA chez des larves de *X. laevis* exposées à des NTCMW bruts (0,1 ; 1 et 10 mg/L) pendant 2, 4, 8, 12 et 24 h. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart-type. CTRL : contrôle négatif, MW0,1 ; MW 1 et MW 10 : NTCMW bruts à une concentration de 0,1 ; 1 et 10 mg/L, respectivement.

* : indique une induction significative ($P < 0,05$) des activités enzymatiques en comparaison avec le contrôle négatif

L'exposition des larves à une concentration de 0,1 mg/L induit une production significative de MDA à 4 et 12 h qui atteint respectivement des valeurs de $1,3 \pm 0,1$ et $0,9 \pm 0,03$ $\mu\text{mole/mg}$ de poids frais. À 2, 8 et 24 h aucune différence significative n'a pu être observée entre les larves témoins et celles exposées aux NTCMW.

La présence de NTCMW à une concentration de 1 mg/L dans le milieu entraîne une induction maximale de la production de MDA dès 2 h d'exposition. En effet, la concentration de MDA a atteint la valeur de $1,5 \pm 0,2$ $\mu\text{mole/mg}$ de poids frais alors que le contrôle négatif était de seulement $0,8 \pm 0,1$ $\mu\text{mole/mg}$ de poids frais. La production de MDA diminue ensuite progressivement à des valeurs de $0,5 \pm 0,01$ et de $0,5 \pm 0,05$ $\mu\text{mole/mg}$ de poids frais à 8 et 12 h, respectivement ($p > 0,05$) pour finir par ré-augmenter à 24 h ($p > 0,05$).

À la concentration de 10 mg/L de NTCMW, une production significative de MDA est observée à partir de 12 h avec une valeur de $0,72 \pm 0,04$ $\mu\text{mole/mg}$ de poids frais. La concentration en MDA augmente ensuite pour atteindre un taux maximal de $1,4 \pm 0,05$ $\mu\text{mole/mg}$ de poids frais à la fin du temps d'exposition ($P < 0,05$).

III.3.5. Evaluation des effets génétiques des NTCMW par le test des Comètes

L'impact des NTCMW sur l'ADN a été évalué grâce au test des Comètes (**paragraphe III.1.3**), réalisé sur des érythrocytes de larves de *X. laevis* exposées pendant 2, 4, 8 et 24 h à des concentrations de 0,1 ; 1 et 10 mg/L de NTCMW bruts. Les résultats obtenus sont représentés dans le **tableau III.4**.

Les larves ayant été exposées à une concentration de 10 mg/L de NTCMW présentaient un pourcentage de viabilité des érythrocytes très inférieur à 90%. En référence aux travaux de Collins *et al.*, (Collins, 2002), les essais Comètes n'ont pas été réalisés à cette concentration. Pour la concentration de 0,1 mg/L de NTCMW, les résultats obtenus montrent une induction significative des paramètres mesurés (Tail DNA, TL) avec une oscillation des valeurs au cours du temps d'exposition.

En effet, le Tail DNA et TL atteignent des valeurs respectives de $12,4 \pm 0,7$ et de $70,7 \pm 1,3$ après 4 h d'exposition, pour ensuite diminuer au niveau du contrôle à 8 h. Ces deux

paramètres augmentent à nouveau de façon significative à 24 h pour atteindre des valeurs de $14,3 \pm 0,7$ (Tail DNA) et $44,4 \pm 0,8$ (TL).

Tableau III.4. : Résultats des essais comètes sur les érythrocytes des larves de *X. laevis* exposées à 0,1 (MW 0,1) et 1 mg/L (MW1) de NTCMW bruts pendant 2, 4, 8 et 24 h.

* : indique une augmentation significative des dommages à l'ADN ($p < 0,05$) en comparaison avec le contrôle négatif.

CP/CN : contrôle positif/ contrôle négatif

Les essais Comètes n'ont pas été réalisés sur les érythrocytes de larves exposées à une concentration de 10 mg/L de NTCMW dont la viabilité était inférieure à 90%.

Temps (h)	Paramètre mesuré	MW 0,1			MW 1	
		CP	CN	MW	CN	MW
2	Tail DNA	$19,3 \pm 0,9^*$	$7,4 \pm 0,4$	$8,7 \pm 0,5$	$3,1 \pm 0,2$	$22,3 \pm 1,1^*$
	TL	$46,6 \pm 0,9^*$	$30,2 \pm 0,6$	$35,5 \pm 0,7$	$24,2 \pm 0,4$	$50,9 \pm 0,9^*$
4	Tail DNA	$26,6 \pm 1,1^*$	$5,1 \pm 0,2$	$12,4 \pm 0,6^*$	$2,5 \pm 0,2$	$17,5 \pm 0,8^*$
	TL	$56,5 \pm 1,1^*$	$50,8 \pm 1,2$	$70,7 \pm 1,3^*$	$30,8 \pm 0,6$	$48,1 \pm 0,9^*$
8	Tail DNA	$23,7 \pm 1,0^*$	$5,2 \pm 0,3$	$7,5 \pm 0,4$	$3,1 \pm 0,2$	$14,4 \pm 0,8^*$
	TL	$52,7 \pm 1,0^*$	$37,3 \pm 0,9$	$35,7 \pm 0,7$	$29,8 \pm 0,6$	$49,1 \pm 0,9^*$
24	Tail DNA	$22,1 \pm 1,0^*$	$5,0 \pm 0,2$	$14,3 \pm 0,7^*$	$3,2 \pm 0,2$	$34,9 \pm 1,4^*$
	TL	$43,5 \pm 0,9^*$	$40,9 \pm 0,9$	$44,4 \pm 0,8^*$	$31,2 \pm 0,7$	$55,8 \pm 0,9^*$

A une concentration de 1 mg/L de NTCMW, une induction significative des dommages de l'ADN est observée à tous les temps d'exposition et pour l'ensemble des paramètres mesurés. Le taux maximal de cassure de l'ADN a été mesuré à 24 h d'exposition avec des valeurs de $34,9 \pm 1,4$ (Tail DNA) et de $55,8 \pm 0,9$ (TL). Les résultats ne montrent cependant aucune variation significative des dommages basaux de l'ADN dans le temps pour les contrôles négatifs. Les résultats obtenus avec le MMS (contrôle positif) confirment le bon fonctionnement du test mis en œuvre dans cette étude.

IV. Discussion

L'étude des résultats présentés dans ce chapitre mettent clairement en évidence une induction du stress oxydant chez des larves de *Xenopus laevis* exposées à des NTCMW. Cette induction est illustrée par une augmentation significative de la production de peroxyde d'hydrogène en fonction du temps et de la dose d'exposition. Le stress oxydant s'est également caractérisé par une induction des enzymes impliquées dans la détoxification des espèces réactives de l'oxygène tel l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

Dans le cadre de nos expérimentations, une augmentation significative de la production d' H_2O_2 a été observée à partir de 4 h, chez les larves exposées à une concentration de 1 mg/L. Cette production est ensuite restée significativement différente du contrôle négatif jusqu'à 12 h puis a diminué à 24 h. Pour la concentration la plus élevée de NTCMW testée (10 mg/L), la production d' H_2O_2 était significative dès 2 h d'exposition puis a diminué rapidement après 8 h. Une production moins importante d' H_2O_2 a été ré-observée à partir de 12 h ($p < 0,05$).

Ces résultats indiquent d'une part, qu'il n'y a pas une relation directe entre la production d' H_2O_2 et la concentration en NTCMW dans le milieu d'exposition. D'autre part, nous pouvons constater que le temps de latence entre l'exposition et la réponse diminue avec la concentration de NTCMW (plus la dose augmente plus la réponse est précoce). Il est important de souligner que dans nos conditions expérimentales la production d' H_2O_2 semble décroître après induction, et forme parfois des oscillations. Ces observations permettent de penser qu'il existe une régulation importante du taux d' H_2O_2 chez la larve de xénope.

Les espèces réactives de l'oxygène ont une durée de vie très courte car ils sont chimiquement très réactifs, à cause de la présence d'un électron singulet sur les dernières orbitales. Dans cet état, les électrons ont une forte tendance à former de nouvelles liaisons, conduisant à des réactions chimiques, pouvant entraîner des réactions en chaîne et de nouveaux radicaux libres.

La production d'ERO est un paramètre dynamique, ils sont en effet générés et éliminés en permanence au niveau des cellules (Lushchak, 2011). Même si leur production est toxique pour l'organisme, les ERO jouent un rôle important dans la signalisation et la régulation des cellules avec une implication particulière dans les processus de division et d'apoptose. Ce processus est par conséquent d'une importance capitale chez les larves de *X. laevis*, qui au stade 50, sont en état de métamorphose permanente (Menon and Rozman, 2007). Cet élément pourrait justifier les oscillations de la production d'H₂O₂ observée chez les contrôles négatifs ainsi que des niveaux d'activités élevés des enzymes intervenant dans le contrôle du stress oxydant. En outre, la concentration en H₂O₂ produit ne semble pas être corrélée au temps de réponse des larves en fonction de la concentration des NTCMW. En effet, dans le cadre de nos expérimentations la concentration maximale d'H₂O₂ a été obtenue après exposition des larves à la concentration de 1 mg/L de NTCMW bruts pendant 12 h ($3,2 \pm 0,2$ mmole/mg de poids frais). Lorsque les larves de xénope sont exposées à une concentration de 10 mg/L de NTCMW bruts, l'induction maximale de la production d'H₂O₂ est observée après seulement 2 h. Cette production diminue ensuite puis ré-augmente pour atteindre une valeur plus faible ($2,1 \pm 0,4$ mole/mg), ce qui laisse penser que le maximum de production d'H₂O₂ aurait été atteint avant 2 h. Ce phénomène est assez courant dans la cas de contaminations aquatiques et a été décrit par Lushchak (Lushchak, 2011).

Le system antioxydant inclut des composés hydrosolubles tels que le glutathion sous sa forme réduite, l'acide ascorbique ainsi que des molécules liposolubles comme les caroténoïdes, le rétinol et l' α -tocophérol. Ces molécules agissent généralement comme des piègeurs de radicaux libres mais peuvent également servir de cofacteur d'enzymes de réponse au stress oxydant tel que le glutathion. Les voies enzymatiques les plus importantes dans la réponse à une production de ROS sont la SOD, qui permet la conversion de l'O₂⁻ en H₂O₂ et la catalase qui va assurer la transformation de ce dernier en H₂O et O₂ (Donaldson et al., 2006). En plus

de l'action de la CAT, la GPX est impliquée dans la mobilisation de l'H₂O₂ par le biais de l'utilisation du glutathion réduit (GSH) comme donneur d'électrons et entraîne la formation du glutathion oxydé (GSSG) qui va être réduit à son tour par la glutathion réductase.

Lors de cette étude, les résultats obtenus montrent que l'induction des activités enzymatiques anti-oxydantes, ne suit pas une simple relation dose-effet. L'activité GR est en effet induite à partir de 8 h d'exposition à 0,1 mg/L de NTCMW. A la concentration de 1 mg/L de NTC bruts, une induction significative a été observée après 4 h (induction maximale) et 8 h d'exposition, puis a diminué progressivement jusqu'à 24 h. Dans le cas de la plus forte concentration testée (10 mg/L), l'induction est significative seulement à 2 h et est suivie par une rapide diminution.

Pour l'activité catalase, une induction maximale a été observée à partir de 4 h d'exposition à 1 mg/L de NTCMW. A 10 mg/L de NTCMW bruts, l'induction de l'activité CAT était plus précoce, et a atteint son taux maximal d'induction après seulement 2 h d'exposition.

Pour l'activité SOD, une induction significative a été observée seulement dans le cas des expositions aux fortes concentrations. Son taux maximal a été atteint à partir de 2 h de contact avec les NTCMW bruts. L'implication de l'H₂O₂ dans la régulation des enzymes du stress oxydant chez les organismes aquatiques a largement été décrite dans la littérature [168]. Lorsque le niveau de d'anion superoxyde est bas, l'activité des peroxydases est dominante. Ces dernières vont réguler la superoxyde dismutase par l'inhibition du substrat et réduire par conséquent le taux d' H₂O₂ dans les cellules (Gottfredsen et al., 2013). L'absence d'une activation significative de la SOD en présence des faibles concentrations de NTCMW bruts (0,1 et 1 mg/L) suggère aussi la présence d'autres sources de production d'H₂O₂. En effet, plusieurs enzymes telles que la glucose oxydase, l'ureate oxydase et l'acide aminé oxydase sont connues pour leur implication dans la production d'H₂O₂ (Cadenas and Davies, 2000; Szatrowski and Nathan, 1991). Ces enzymes sont généralement localisées au niveau des

organites cellulaires tels que les peroxysomes. D'autres enzymes comme les Monoamines oxydase, que l'on retrouve essentiellement dans les membranes mitochondriales, sont également impliquées dans la production de peroxyde d'hydrogène (Edmondson, 2014; Sandri et al., 1990).

Le stress oxydant est considéré comme une voie importante de la toxicité des nanoparticules et plus particulièrement les nanotubes de carbone chez différents organismes et types cellulaires (Shvedova et al., 2012). Les NTC peuvent activer l'inflammasome par leur interaction avec les phagocytes, et accroître de façon importante la production des ERO. De la même manière, une altération de la chaîne respiratoire mitochondriale peut favoriser une hausse de la production d'espèces réactives de l'oxygène et ainsi de l' H_2O_2 . De plus, il a été rapporté que les NTCMW étaient capables de piéger certains radicaux libres tels que l' O_2^\cdot et OH^\cdot , indépendamment de la façon dont ils ont été générés (Fenoglio et al., 2006). L'ensemble de ces données suggère une interaction complexe entre les NTCMW et les larves de *X. laevis*, conduisant à une perturbation du statut redox des cellules de l'organisme, à la fois par l'induction et/ou le piégeage des radicaux libres.

De par leur géométrie et leur surface hydrophobe, les NTC ont tendance à former des agglomérats. Cependant, au sein de l'environnement, les NTC ne vont pas forcément être retrouvés sous leurs formes brutes. En effet, la présence de nombreux composés organiques dans les eaux naturelles va entraîner leur dispersion (Landois, 2008). Il a été rapporté dans la littérature que le type et le degré d'agglomération des NTC pouvait modifier leur toxicité (Wick et al., 2007). Dans le cadre de nos travaux, l'impact de la dispersion des NTC sur l'induction du stress oxydant a été évalué après dispersion de la plus faible concentration de NTCMW (0,1 mg/L) par de la matière organique naturelle extraite de la « Suwannee River ». Les résultats obtenus ne montrent aucune différence significative sur la production d' H_2O_2 , en comparaison avec le contrôle négatif mais aussi avec les larves exposées aux NTCMW.

Comme pour le cas du peroxyde d'hydrogène aucune induction des activités enzymatiques, GR, CAT et SOD, n'a pu être mise en évidence après exposition de larves à 0,1 mg/L de NTCMW dispersés. Cette absence d'effets peut être justifiée par une réduction de la taille des agglomérats de NTCMW après leur dispersion par la MO. En effet, plusieurs travaux ont mis en évidence l'implication de la dispersion des NTC dans réduction de leur taille et la diminution de leur toxicité, *in vitro* (Davis et al., 1986 ; Kostarelos, 2008). A l'état brut, les interactions de van der Waals entre les particules de NTC, les poussent à former des agrégats dont la taille est supérieure à 100 μm de diamètre (Nativ-Roth et al., 2007). L'administration de ces agrégats semble être associée à une toxicité pulmonaire et une induction d'un stress oxydant, chez des rongeurs (Lam et al., 2004; Warheit et al., 2004). Par ailleurs Lorsque des nanotubes de carbone sont inhalés sous leur forme initiale, une formation de granulomes, associée à une légère fibrose a été observée chez la souris (Mutlu et al., 2010). Au contraire, l'administration de ces mêmes nanotubes sous une forme dispersée n'a entraîné aucun effet (Mutlu et al., 2010). Bien que les mécanismes biochimiques responsables de la toxicité des NTC ne soient pas encore entièrement connus, l'un des principaux concepts relatifs à cette toxicité serait attribué à leur capacité de générer des ERO (Alarifi et al., 2014; Shvedova et al., 2014; Wang et al., 2014). Ces derniers peuvent avoir des conséquences non négligeables sur différents compartiments cellulaires dont la membrane plasmique. En effet, les acides gras polyinsaturés des membranes cellulaires représentent la cible principale des ERO. Il en résulte la formation de peroxydes lipidiques. Ces derniers se décomposent en plusieurs sous-produit tels que le malondialdéhyde (MDA) ou encore le 4-hydroxynonéanal (4-HNE).

Dans le but d'évaluer l'impact des ERO induit par une exposition à différentes concentrations de NTCMW, des dosages de MDA ont été réalisés à l'échelle de la larve entière (**figure III.10**). Les résultats obtenus montrent une production significative de MDA à partir de 4 h chez les larves exposées à une concentration de 0,1 mg/L de NTCMW bruts.

Pour les larves placées dans une suspension contenant 1 mg/L de NTCMW, l'induction de MDA est apparue plus précocement. En effet, le maximum de sa production a été observé à partir de 2 et 4 h d'exposition puis a diminué progressivement pour atteindre des valeurs similaires à celles du contrôle négatif à partir de 8 h. En ce qui concerne les animaux exposés aux plus fortes concentrations de NTCMW, une induction significative de la peroxydation des lipides est apparue plus tardivement (après 12 h d'exposition). Ce qui suggère une induction beaucoup plus précoce comme observée dans le cas des enzymes du stress oxydant. Cette induction précoce de la peroxydation des lipides en réponse à une exposition aux NTC a déjà été démontré *in vitro* par Kagan *et al.*, (Kagan et al., 2006).

Même si elle ne constitue pas la seule voie génotoxique, le stress oxydant a été décrit comme étant principalement impliquée dans la formation des lésions de l'ADN (Halliwell, 1990; Petersen and Nelson, 2010) en induisant des dommages primaires tels que les bases oxydées, les cross-links, des cassures simples ou doubles brin, des sites alcali-labiles, *etc.* Dans le cadre de cette étude une évaluation de l'impact des NTCMW sur l'ADN a été réalisée par le test des Comètes en milieu alcalin sur des érythrocytes de larves de *X. laevis*. Chez les larves exposées à une concentration de 10 mg/L de NTCMW bruts, une évaluation de la viabilité cellulaire par le test d'exclusion au Bleu de Trypan nous a permis de mettre en évidence une baisse de la viabilité des cellules dès 2 h d'exposition, nous empêchant ainsi de réaliser les essais Comète sur ces échantillons comme recommandé par Collins (Collins, 2002). En comparaison avec le contrôle négatif, un endommagement significatif de l'ADN a été observé après 4 et 24 h d'exposition à une concentration de 0,1 mg/L de NTCMW bruts. Par contre, aucun effet, n'a pu être détecté à 2 et 8 h d'exposition. Par ailleurs, chez les larves exposées à une concentration de 1 mg/L de NTCMW bruts, des dommages significatifs à l'ADN ont été mesurés à tous les temps d'exposition. Les résultats de comparaison des moyennes obtenus avec les deux concentrations de NTCMW sont représentés sur le **tableau III.4**. On peut

observer que le taux de dommages à l'ADN est plus important chez les larves exposées à une concentration de 1 mg/L de NTCMW bruts, suggérant une relation dose-repose indépendamment du paramètre mesuré et du temps d'exposition. Cette induction maximale des dommages à l'ADN, observée à une concentration de 1 mg/L de NTCMW correspond à la plus forte production d'H₂O₂ et d'activités enzymatiques enregistrée. Cependant, les enzymes du stress oxydant et les dommages à l'ADN ne sont pas induits au même moment. Cette différence peut être due à la source de l'échantillon dosé. En effet, alors que l'altération de l'ADN a été évaluée au niveau des érythrocytes du sang circulant des larves, l'induction des activités enzymatiques et la production d'H₂O₂ ont été réalisés à l'échelle de la larve entière. Néanmoins, le profil de lésions à l'ADN, la production d'H₂O₂ et du MDA ainsi que l'induction des activités enzymatiques du stress oxydant montrent une fluctuation dans le temps. Ces variations sont une manifestation typique du phénomène de stress oxydant et de l'équilibre du système redox qui se caractérise par une balance continue entre dommages et compensation / réparation. Ceci inclut le système de réparation de l'ADN basé sur des enzymes d'excision/ resynthèse au niveau des sites endommagés qui peuvent également être mesurés par le test des Comète (Petersen and Nelson, 2010). On peut toutefois constater que les dommages à l'ADN mesurés au niveau des érythrocytes ont été détectés plus précocement que les activités enzymatiques. Le test des Comètes peut donc être considéré comme un outil plus sensible pour l'évaluation de l'impact des NTCMW dans le cadre de notre étude.

V. Conclusion

L'ensemble des résultats obtenus dans ce chapitre montre qu'une exposition des larves de *Xenopus laevis* à des NTCMW bruts entraîne une induction du stress oxydant. Ce dernier est caractérisé par une augmentation de la production d'ERO, d'enzymes intervenant dans la régulation du stress oxydatif et de MDA au niveau de la larve entière, et par l'apparition de lésions à l'ADN au niveau des érythrocytes. Cependant le taux d'induction de ces différents dommages semble être étroitement lié à la concentration des NTCMW bruts dans le milieu d'exposition. L'apparition précoce de lésions à l'ADN au niveau des érythrocytes, en comparaison avec les autres paramètres mesurés indique que le test des Comète est la technique la plus sensible pour l'évaluation d'effets pouvant être associés au stress oxydatif.

La présence de NTCMW sous une forme dispersée ne semble pas affecter l'équilibre du système redox des larves. En effet, aucune induction des activités enzymatiques n'a été observée quelle que soit la durée de l'exposition. L'évaluation de l'impact du stress oxydant induit par une exposition à différentes concentrations de NTCMW bruts nous a permis de mettre en évidence une induction de la peroxydation des lipides et de lésions à l'ADN. L'identification de sources potentielles du stress oxydant induit par une exposition à des NTCMW bruts est toutefois essentielle pour une meilleure compréhension du mécanisme d'action de ces nanoparticules carbonées.

Références bibliographiques

Alarifi, S., Ali, D., Verma, A., Almajhdi, F.N., Al-Qahtani, A.A., **2014**. Single-walled carbon nanotubes induce cytotoxicity and DNA damage via reactive oxygen species in human hepatocarcinoma cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 50, 714-722.

Alpatova, A.L., Shan, W., Babica, P., Upham, B.L., Rogensues, A.R., Masten, S.J., Drown, E., Mohanty, A.K., Alocilja, E.C., Tarabara, V.V., **2010**. Single-walled carbon nanotubes dispersed in aqueous media via non-covalent functionalization: effect of dispersant on the stability, cytotoxicity, and epigenetic toxicity of nanotube suspensions. *Water Res.* 44, 505-520.

Bottini, M., Bruckner, S., Nika, K., Bottini, N., Bellucci, S., Magrini, A., Bergamaschi, A., Mustelin, T., **2006**. Multi-walled carbon nanotubes induce T lymphocyte apoptosis. *Toxicol Lett.* 160, 121-126.

Bourdiol, F., **2013a**. Evaluation de l'écotoxicité de nanotubes de carbone en milieu aquatique à l'aide du modèle amphibien *xenopus laevis* : synthèse, protocoles d'exposition, détection et dosage. [Thèse]. Université Paul Sabatier, Toulouse.

Bourdiol, F., Mouchet, F., Perrault, A., Fourquaux, I., Datas, L., Gancet, C., Boutonnet, J.C., Pinelli, E., Gauthier, L., Flahaut, E., **2013b**. Biocompatible polymer-assisted dispersion of multi walled carbon nanotubes in water, application to the investigation of their ecotoxicity using *Xenopus laevis* amphibian larvae. *Carbon.* 54, 175-191.

Bradford, M.M., **1976**. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72, 248-254.

Cadenas, E., Davies, K.J., **2000**. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med.* 29, 222-230.

Collins, A.R., **2002**. The comet assay. Principles, applications, and limitations. *Methods Mol Biol.* 203, 163-177.

Davis, J.M., Addison, J., Bolton, R.E., Donaldson, K., Jones, A.D., Smith, T., **1986**. The pathogenicity of long versus short fibre samples of amosite asbestos administered to rats by inhalation and intraperitoneal injection. *Brit J Exp Pathol.* 67, 415-430.

Donaldson, K., Aitken, R., Tran, L., Stone, V., Duffin, R., Forrest, G., Alexander, A., **2006**. Carbon nanotubes: a review of their properties in relation to pulmonary toxicology and workplace safety. *Toxicol Sci.* 92, 5-22.

Edmondson, D.E., **2014**. Hydrogen peroxide produced by mitochondrial monoamine oxidase catalysis: biological implications. *Curr Pharm Des.* 20, 155-160.

Fenoglio, I., Tomatis, M., Lison, D., Muller, J., Fonseca, A., Nagy, J.B., Fubini, B., **2006**. Reactivity of carbon nanotubes: free radical generation or scavenging activity?. *Free Radic Biol Med.* 40, 1227–1233.

Gottfredsen, R.H., Larsen, U.G., Enghild, J.J., Petersen, S.V., **2013**. Hydrogen peroxide induce modifications of human extracellular superoxide dismutase that results in enzyme inhibition. *Redox Biol.* 1, 24–31.

Halliwell, B., 1990. How to characterize a biological antioxidant. *Free Radical Res Com.* 9, 1–32.

Hyung, H., Fortner, J.D., Hughes, J.B., Kim, J.H., **2007**. Natural Organic Matter Stabilizes Carbon Nanotubes in the Aqueous Phase. *Environ Sci Technol.* 41, 179–184.

Kagan, V. E., Tyurina, Y.Y., Tyurin, V.A., Konduru, N.V., Potapovich, A.I., Osipov, A.N., Kisin, E.R., Schwegler-Berry, D., Mercer, R., Castranova, V., Shvedova, A. A., **2006**. Direct and indirect effects of single walled carbon nanotubes on RAW 264.7 macrophages: Role of iron. *Toxicol Lett.* 165, 88–100.

Kostarelos, K., **2008**. The long and short of carbon nanotube toxicity. *Nat Biotech.* 26, 774–776.

Krysanov, E.Y., Pavlov, D.S., Demidova, T.B., Dgebuadze, Y.Y., **2010**. Effect of nanoparticles on aquatic organisms. *Biology Bull.* 37, 406–412.

Lam, C.W., James, J.T., McCluskey, R., Hunter, R.L., **2004**. Pulmonary toxicity of singlewall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. *Toxicol Sci.* 77, 126–134.

Landois, P., **2008**. Synthèse, fonctionnalisation et impact sur l'environnement de nanotubes de carbone. [Thèse]. Université Paul Sabatier, Toulouse.

Lefèvre, G., Beljean-Leymarie, M., Beyerle, F., Bonnefont-Rousselot, D., Cristol, J.P., Thérond, P., Torreilles, J., **1998**. Evaluation de la peroxydation lipidique par le dosage des substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique. *Ann Biol Clin-Paris.* 56, 305-319.

Lushchak, V.I., **2011**. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat Toxicol.* 101, 13–30.

Menon, J., Rozman, R., **2007**. Oxidative stress, tissue remodeling and regression during amphibian metamorphosis. *Com Bioch Phys C.* 145, 625–631.

Mitchell, L.A., Gao, J., Wal, R.V., Gigliotti, A., Burchiel, S.W., McDonald, J.D., **2007**. Pulmonary and systemic immune response to inhaled multiwalled carbon nanotubes. *Toxicol Sci.* 100, 203–214.

Monteiro-Riviere, N.A., Nemanich, R.J., Inman, A.O., Wang, Y.Y., Riviere, J.E., **2005**. Multi-walled carbon nanotube interactions with human epidermal keratinocytes. *Toxicol Lett.* 155, 377–384.

Mouchet, F., Gauthier, L., Mailhes, C., Ferrier, V., Devaux, A., **2005**. Comparative study of the comet assay and the micronucleus test in amphibian larvae (*Xenopus laevis*) using benzo(a)pyrene, ethyl methanesulfonate, and methyl methanesulfonate: establishment of a positive control in the amphibian comet assay. *Environ Toxicol.* 20, 74–84.

Mouchet, F., Ferrier, V., Devaux, A., **2002**. Validation du test comète sur larves d'amphibiens (*Xenopus laevis* et *Pleurodeles Waltl*) et application du potentiel génotoxique de sols, sédiments et déchets contaminés comparaison avec le test micronoyau amphibien. [Thèse]. Université Paul Sabatier, Toulouse.

Mouchet, F., Landois, P., Sarremejean, E., Bernard, G., Puech, P., Pinelli, E., Flahaut, E., Gauthier, L., **2008**. Characterisation and in vivo ecotoxicity evaluation of double-wall carbon nanotubes in larvae of the amphibian *Xenopus laevis*. *Aquat Toxicol.* 87, 127–137.

Mutlu, G.M., Budinger, G.R.S., Green, A.A., Urich, D., Soberanes, S., Chiarella, S.E., Alheid, G.F., McCrimmon, D.R., Szleifer, I., Hersam, M.C., **2010**. Biocompatible Nanoscale Dispersion of Single-Walled Carbon Nanotubes Minimizes in vivo Pulmonary Toxicity. *Nano Lett.* 10, 1664–1670.

Nativ-Roth, E., Shvartzman-Cohen, R., Bounioux, C., Florent, M., Zhang, D., Szleifer, I., Yerushalmi-Rozen, R., **2007**. Physical Adsorption of Block Copolymers to SWNT and MWNT: A Nonwrapping Mechanism. *Macromolecules.* 40, 3676–3685.

Ohkawa, N.O., **1979**. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal biochem.* 95, 351–8.

Patlolla, K.A., **2013**. Environmental Toxicity Monitoring of Nanomaterials using Vicia Faba GENE-TOX Assay. *J Nanomed Nanotechnol.* 4, 129.

Petersen, E.J., Nelson, B.C., **2010**. Mechanisms and measurements of nanomaterial-induced oxidative damage to DNA. *Anal Bioanal Chem.* 398, 613–650.

Poland, C.A., Duffin, R., Kinloch, I., Maynard, A., Wallace, W.A.H., Seaton, A., Stone, V., Brown, S., MacNee, W., Donaldson, Ken, **2008**. Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. *Nature Nanotechnol.* 3, 423–428.

R Development Core Team, 2012. R development Core Team. R : A Language and Environment for statistical Computing, 3-900051-07-0R Fondation for Statistical Computing, Vienna, Austria (**2012**).

Sandri, G., Panfilì, E., Ernster, L., **1990**. Hydrogen peroxide production by monoamine oxidase in isolated rat-brain mitochondria: its effect on glutathione levels and Ca²⁺ efflux. *Biochim Biophys Acta.* 1035, 300–305.

Saria, R., Mouchet, F., Perrault, A., Flahaut, E., Laplanche, C., Boutonnet, J.-C., Pinelli, E., Gauthier, L., **2014**. Short term exposure to multi-walled carbon nanotubes induce oxidative stress and DNA damage in *Xenopus laevis* tadpoles. *Ecotox Environ Safe.* 107, 22–29.

Schwyzer, I., Kaegi, R., Sigg, L., Nowack, B., **2013**. Colloidal stability of suspended and agglomerate structures of settled carbon nanotubes in different aqueous matrices. *Nanotechnol Water Wastewater Treatment*. 47, 3910–3920.

Shvedova, A. A., Kisin, E.R., Murray, A.R., Mouithys-Mickalad, A., Stadler, K., Mason, R.P., Kadiiska, M., **2014**. ESR evidence for in vivo formation of free radicals in tissue of mice exposed to single-walled carbon nanotubes. *Free Radical Bio Med*. 73, 154–165.

Shvedova, A.A., Pietroiusti, A., Fadeel, B., Kagan, V.E, **2012**. Mechanisms of carbon nanotube-induced toxicity: focus on oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol*. 261, 121–133.

Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., **1988**. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 175, 184–191.

Szatrowski, T.P., Nathan, C.F., **1991**. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res*. 51, 794–798.

Tice, R.R., Andrews, P.W., Hirai, O., Singh, N.P., **1991**. The single cell gel (SCG) assay: an electrophoretic technique for the detection of DNA damage in individual cells. *Adv Exp Med Biol*. 283, 157–164.

Van der Zande, M., Junker, R., Walboomers, X.F., Jansen, J.A., **2011**. Carbon nanotubes in animal models: a systematic review on toxic potential. *Tissue Eng Part B Rev*. 17, 57–69.

Wang, C., Liu, H., Chen, J., Tian, Y., Shi, J., Li, D., Guo, C., Ma, Q., **2014**. Carboxylated multi-walled carbon nanotubes aggravated biochemical and subcellular damages in leaves of broad bean (*Vicia faba* L.) seedlings under combined stress of lead and cadmium. *J Hazard Mater*. 274, 404–412.

Warheit, D.B., Laurence, B.R., Reed, K.L., Roach, D.H., Reynolds, G. a. M., Webb, T.R., **2004**. Comparative Pulmonary Toxicity Assessment of Single-wall Carbon Nanotubes in Rats. *Toxicol. Sci*. 77, 117–125.

Wick, P., Manser, P., Limbach, L.K., Dettlaff-Weglikowska, U., Krumeich, F., Roth, S., Stark, W.J., Bruinink, A., **2007**. The degree and kind of agglomeration affect carbon nanotube cytotoxicity. *Toxicol Lett*. 168, 121–131.

Zhao, X., Liu, R., **2012**. Recent progress and perspectives on the toxicity of carbon nanotubes at organism, organ, cell, and biomacromolecule levels. *Environ Int*. 40, 244–255.

Lire
la seconde partie
de la thèse